

**Biologische Nitratentfernung in Wasserkreisläufen  
von ausgewählten Industriebetrieben nach  
Anwendung von Aluminiumnitratsulfat**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
– Dr. rer. nat. –**

**vorgelegt von**

**Arne Hörsken  
aus Duisburg**

**Biofilm Centre im  
Fachbereich Chemie  
der Universität Duisburg-Essen  
(Campus Duisburg)**

Datum der Disputation: 04.11.2008

Vorsitzender: Prof. Dr. Stephan Schulz

Referent: Prof. Dr. Hans-Curt Flemming

Korreferent: Dr. habil. Martin Denecke

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 2004 bis Juli 2008 im Biofilm Centre, Arbeitsgruppe Aquatische Mikrobiologie von Prof. Flemming, Fachbereich Chemie, Universität Duisburg-Essen erstellt.

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

---

Arne Hörsken

*Auch der längste Weg beginnt . . .*

*. . . mit einem ersten Schritt*

Chinesische Weisheit

doch bedenke . . .

*Viele verfolgen hartnäckig den Weg, den sie gewählt haben,  
aber nur wenige das Ziel*

Friedrich Nietzsche

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>2</b>
1.1 EINFÜHRUNG.....	2
1.2 EINSATZ SAURER ALUMINIUMSALZE IN INDUSTRIELLEN WASSERSYSTEMEN.....	2
1.3 INDUSTRIELLE PAPIERHERSTELLUNG.....	10
1.4 EINSATZ VON ALUMINIUMSALZLÖSUNGEN IN DER PAPIERERZEUGENDEN INDUSTRIE .....	13
1.5 PROBLEME BEI DER VERWENDUNG VON SAUREN ALUMINIUMSALZEN IN WASSERKREISLAUFSYSTEMEN.....	15
1.5.1 PROBLEME BEI VERWENDUNG VON ALUMINIUMSULFAT .....	16
1.5.2 PROBLEME BEI VERWENDUNG VON ALUMINIUM(HYDROXID)CHLORID .....	19
1.5.3 EINENGUNG / SCHLIEßUNG VON WASSERKREISLÄUFEN UND VERWENDUNG VON ALTPAPIER.....	20
1.5.4 MÖGLICHER EINSATZ VON ALUMINIUMNITRAT .....	21
1.6 BIOFILME .....	22
1.7 STICKSTOFFKREISLAUF .....	26
1.8 DENITRIFIKATION.....	28
1.8.1 NITRIFIKATION / DENITRIFIKATION IN DER BELEBTSCHLAMMFLOCKE.....	31
1.8.2 DENITRIFIKATION IM INDUSTRIELLEN WASSERKREISLAUFSYSTEM .....	33
<b>2 ZIELE UND WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>35</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>36</b>
3.1 NÄHRMEDIEN .....	36
3.2 ALLGEMEINE LABORGERÄTE.....	38
3.3 VERGLEICH DER KOAGULATIONSEIGENSCHAFTEN .....	38
3.4 CHEMISCHE ANALYTIK.....	40
3.4.1 BESTIMMUNG DES TROCKENRÜCKSTANDES .....	40
3.4.2 BESTIMMUNG DES GLÜHVERLUSTES DER TROCKENMASSE .....	40
3.4.3 BESTIMMUNG VON NITRAT .....	41
3.4.4 BESTIMMUNG VON NITRIT.....	42
3.4.5 CHEMISCHER SAUERSTOFFBEDARF .....	43

3.4.6	GELÖSTER ORGANISCHER KOHLENSTOFF (DOC) UND GESAMTER ORGANISCHER KOHLENSTOFF (TOC).....	43
3.5	MIKROBIOLOGISCHE ANALYTIK .....	44
3.5.1	KOLONIEZAHL-BESTIMMUNG (KBE) MIT R2A- UND CASO-AGAR .....	44
3.5.2	GESAMTZELLZAHLBESTIMMUNG MIT DER DAPI-METHODE .....	44
3.5.3	NACHWEIS VON NITRATREDUZIERENDEN BAKTERIEN .....	45
3.5.4	IDENTIFIZIERUNG VON BAKTERIEN .....	46
3.6	BIOREAKTOR-SYSTEM ZUR UNTERSUCHUNG DES MIKROBIELLEN NITRATABBAUS .....	48
3.6.1	NACHWEIS DES MIKROBIELLEN NITRATABBAUS IN DER PAPIERFABRIK 1 .....	49
3.7	BETRIEBSUNTERSUCHUNGEN .....	50
3.7.1	PAPIERFABRIK 1 .....	50
3.7.2	PAPIERFABRIK 2 .....	51
3.7.3	RECYCLINGBETRIEB .....	52
3.7.4	METALLVERARBEITENDER BETRIEB .....	53
3.7.5	TABELLARISCHE ÜBERSICHT DER VIER INDUSTRIEBETRIEBE .....	54
4	ERGEBNISSE .....	55
4.1	ERGEBNISSE DER FLOCKUNGSTESTS .....	55
4.2	CHEMISCHE ANALYSEN AUS DEN BETRIEBSUNTERSUCHUNGEN .....	57
4.2.1	PAPIERFABRIK 1 .....	57
4.2.2	PAPIERFABRIK 2 .....	62
4.2.3	RECYCLINGBETRIEB .....	63
4.2.4	METALLVERARBEITENDER BETRIEB .....	69
4.3	MIKROBIOLOGISCHE ANALYSEN DER BETRIEBSUNTERSUCHUNGEN .....	72
4.3.1	CHARAKTERISIERUNG VON BIOFILMPROBEN .....	73
4.3.2	GESAMTZELLZAHL- UND KOLONIEZAHL-BESTIMMUNG VON BIOFILMPROBEN .....	82
4.3.3	GESAMTZELLZAHL- UND KOLONIEZAHL-BESTIMMUNG VON WASSERPROBEN .....	84
4.3.4	NITRATREDUZIERENDE BAKTERIEN IN BIOFILM- UND WASSERPROBEN .....	87
4.3.5	ZUSAMMENFASSUNG DER MIKROBIOLOGISCHEN ANALYSEN AUS DEN BETRIEBSUNTERSUCHUNGEN .....	89
4.4	NACHWEIS DER MIKROBIOLOGISCHEN NITRATREDUKTION IM INDUSTRIELLEN WASSERKREISLAUF .....	95
4.5	ETABLIERUNG EINES BATCH-REAKTOR-SYSTEMS .....	97
4.5.1	AUSWAHL EINES GEEIGNETEN NÄHRMEDIUMS .....	97
4.5.2	ZELLWACHSTUM IM BATCH-REAKTOR .....	103
4.5.3	CHARAKTERISIERUNG DES INOKULUMS .....	107

4.6	EINFLUSSFAKTOREN AUF DEN NITRATABBAU IN BIOREAKTOREN .....	108
4.6.1	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DEN NITRATABBAU.....	109
4.6.2	EINFLUSS DES PH-WERTES AUF DEN NITRATABBAU.....	114
4.6.3	EINFLUSS DES SALZGEHALTES AUF DEN NITRATABBAU.....	121
4.6.4	EINFLUSS DES NITRATGEHALTES AUF DEN NITRATABBAU.....	125
4.6.5	EINFLUSS DER NITRATQUELLE AUF DEN NITRATABBAU .....	132
4.7	CHARAKTERISIERUNG DER BETEILIGTEN MIKROORGANISMEN .....	135
5	DISKUSSION.....	137
5.1	MIKROBIELLER NITRATABBAU UNTER PRAXISBEDINGUNGEN IN UNTERSCHIEDLICHEN INDUSTRIEBETRIEBEN .....	137
5.2	MIKROBIOLOGISCHE ANALYSEN AUS DEN BETRIEBSUNTERSUCHUNGEN.....	143
5.3	LABORUNTERSUCHUNGEN ZUM MIKROBIELLEN NITRATABBAU .....	153
5.3.1	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DEN NITRATABBAU.....	156
5.3.2	EINFLUSS DES PH-WERTES AUF DEN NITRATABBAU.....	158
5.3.3	EINFLUSS DES SALZGEHALTES AUF DEN NITRATABBAU.....	159
5.3.4	EINFLUSS DES NITRATGEHALTES AUF DEN NITRATABBAU.....	160
5.3.5	EINFLUSS DER NITRATQUELLE AUF DEN NITRATABBAU .....	162
5.4	CHARAKTERISIERUNG DER BETEILIGTEN MIKROORGANISMEN .....	163
5.5	SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	164
5.6	AUSBLICK .....	167
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	169
7	ANHANG .....	177
7.1	LEBENS LAUF.....	177
7.2	PUBLIKATIONS LISTE .....	178

## Abkürzungen

AC	Aluminiumchlorid-Lösung
AKD	Alkylketendimer
ASA	Alkenylbernsteinsäureanhydrid
BSB	Biologischer Sauerstoffbedarf
BSB <sub>5</sub>	Biologischer Sauerstoffbedarf in fünf Tagen
CASO-Agar	Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DIN	Deutsche Industrie-Norm
DOC	Gelöster Organischer Kohlenstoff (Dissolved Organic Carbon)
DSD	Duales System Deutschland
EN	Europäische Norm
FHM	Flockungshilfsmittel
FNU	Formazine Nephelometric Units
FTU	Formazin Turbidity Unit
FW	Frischwasser (aufbereitetes, frisches Wasser für den Betrieb)
ISO	International Organization for Standardization
IR	Infrarot
KBE	Koloniebildende Einheiten
KW	Klarwasser (gereinigtes Kreislaufwasser)
MIC	Microbially influenced corrosion = Mikrobiell beeinflusste Korrosion
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MPN	Most Probable Number
MvB	Metallverarbeitender Betrieb
µeq	Mikroequivalente
NIT 1	Sulfanilsäure in Essigsaurer Lösung
NIT 2	N,N-Dimethyl-1-Naphtylamin in Essigsaurer Lösung
NRB	Nitratreduzierende Bakterien
N <sub>ges</sub>	Summe aus Nitrat-, Nitrit- und Ammonium-Stickstoff
otro	Ofentrocken
PAC	Polyaluminiumchlorid-Lösung (Aluminiumhydroxidchlorid-Lösung)
PAM	Polyacrylamid
pg	Pikogramm. Entspricht 10 <sup>-12</sup> g
ppm	parts per million, z. B. mg/L oder g m <sup>-3</sup>
RB	Recyclingbetrieb
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)



SAK	Spektraler Absorptionskoeffizient
s	Sekunde
SRB	Sulfatreduzierende Bakterien
SW	Siebwasser
TE/F	Trübungseinheiten Formazin
TOC	Gesamter Organischer Kohlenstoff (Total Organic Carbon)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
U/min	Umdrehungen pro Minute
ZRS	Zulauf Reinigungsstufe

## Zusammenfassung

In vielen industriellen Wasserkreisläufen kommt es aufgrund der Wiederverwendung von Wasser zu einer Anreicherung von Wasserinhaltsstoffen und chemischen Additiven. Im Bezug auf anorganische Komponenten wird dieser Effekt als Aufsalzung bezeichnet. Besonders der Einsatz von Eisen- und Aluminiumsalzen als Flockungsmittel resultiert in unerwünscht hohen Ionenkonzentrationen im Wasserkreislauf, die Nachteile im Fertigungsprozess bedeuten und zur Beeinträchtigung der Produktqualität führen können. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der Aufsalzung in Wasserkreislaufsystemen durch den Einsatz von Aluminiumnitratsulfat (ANS) entgegengewirkt werden kann, indem das Nitrat von Mikroorganismen im Wasserkreislauf zu gasförmigem Stickstoff umgesetzt wird. Zu diesem Zweck wurden ursächliche Zusammenhänge zwischen der Aktivität von Mikroorganismen und dem Umsatz von Nitrat unter praxisrelevanten Bedingungen in zwei Papierfabriken, einem Recyclingbetrieb, einem metallverarbeitenden Betrieb und in Laborversuchen mit Batch-Reaktoren untersucht. Mit Ausnahme des metallverarbeitenden Betriebes wurde in den ausgewählten industriellen Wasserkreisläufen ein mikrobieller Nitratabbau festgestellt. Nitratreduzierende Bakterien (NRB) wurden sowohl in der Wasserphase als auch im Biofilm in hohen Konzentrationen nachgewiesen. Bei der Charakterisierung der nitratreduzierenden Mikroorganismen aus einer Papierfabrik wurden Bakterien der Gattungen *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* und *Bacillus* identifiziert. Während der Salzgehalt in Laborversuchen keinen Einfluss auf den Nitratabbau hatte, nahm mit steigender Temperatur im Bereich von 10°C – 40°C auch der mikrobielle Nitratabbau zu. Ab einer Temperatur von 50°C wurde kein mikrobieller Nitratabbau mehr beobachtet. Laborversuche bei pH-Werten von pH 5 und pH 9 zeigten einen deutlich geringeren Nitratabbau als bei pH 7. Hohe anfängliche Nitratkonzentrationen ergaben höhere Nitratabbauraten, dabei war es unerheblich, welches Nitratsalz verwendet wurde. Zu hohe Dosiermengen von ANS senkten bei ungenügender Pufferkapazität des Wassers den pH-Wert, begünstigten oxidierende Verhältnisse und verzögerten dadurch den mikrobiellen Nitratabbau. Aufgrund der Untersuchungen aus dieser Arbeit wurde nach Anwendung von ANS erstmals ein mikrobieller Nitratabbau in industriellen Wasserkreisläufen durch Mikroorganismen in Biofilmen auf Oberflächen und in Flocken nachgewiesen. Die Verwendung von Nitratsalzen in industriellen Wassersystemen könnte sich in der Zukunft nicht nur auf ANS beschränken, auch andere chemische Additive könnten Nitrat als Anion enthalten. Direkt im Wasserkreislauf, im Bioreaktor als Bypass oder in einer nachgeschalteten Kläranlage könnte das Nitrat zu gasförmigem Stickstoff denitrifiziert und damit die Aufsalzung und ihre Folgeprobleme verringert werden.

# **1 Einleitung**

## **1.1 Einführung**

In vielen Industriebetrieben ist Wasser ein wesentlicher Bestandteil der Produktion. Das eingesetzte Wasser wird dabei nicht einmal verwendet um es anschließend als Abwasser in das Gewässer einzuleiten, sondern es wird in vielen Fällen wieder aufbereitet und einer erneuten Verwendung im Betrieb zugeführt. Ein solches Wasserecycling ist ökonomisch und ökologisch sinnvoll, denn die Abwassermenge für das Unternehmen wird minimiert und Kosten können eingespart werden. Doch aufgrund der mehrmaligen Verwendung von Wasser kann es in Wasserkreislaufsystemen zu einer Anreicherung von z. B. ionischen Verbindungen kommen. Einen solchen Anreicherungsprozess bezeichnet man als Aufsalzung. Besonders der Einsatz von Eisen- und Aluminiumsalzlösungen, wie z. B. Eisen(III)-chlorid-Lösung oder Aluminiumsulfat-Lösung tragen hierzu bei. Die unerwünschten hohen Konzentrationen an Fremdionen im Wasserkreislauf können zu Nachteilen im Fertigungsprozess und zur Beeinträchtigung der Produktqualität führen. Es wird daher nach Möglichkeiten gesucht, Wasserkreisläufe weiter schließen zu können, ohne dabei die Aufsalzung voran zu treiben. In dieser Arbeit soll eine mögliche Vorgehensweise untersucht werden, wie man der Aufsalzung in Wasserkreislaufsystemen entgegenwirken kann.

## **1.2 Einsatz saurer Aluminiumsalze in industriellen Wassersystemen**

Als industrielles Wassersystem bezeichnet man die Gesamtheit aus:

- Vorgeschalteter Wasseraufbereitung, die so genanntes Frischwasser oder Betriebswasser für den Industriebetrieb zur Verfügung stellt,
- Produktionskreislauf, in dem Wasser für Produktionszwecke verwendet wird,
- Nachgeschalteter Abwasserbehandlung, in der das Abwasser aus dem Produktionskreislauf gereinigt wird, (Hahn, 1987; Dalpke, 1999; Jung et al., 2006).

Hierbei kann die Aufgabe des vor- bzw. nachgeschalteten Teilsystems durch Anlagen der öffentlichen / privaten Wasserversorgung oder Wasserentsorgung (Kläranlagen) übernommen werden.

Industrielle Wasserkreisläufe, in denen das eingesetzte Wasser nach seiner Verwendung wieder ganz oder teilweise in den Produktionskreislauf zurückgeführt wird, sind zum umweltbewussten Umgang mit der natürlichen Ressource Wasser

ökologisch sinnvoll. Die gestiegenen Kosten für Wasser machen eine mehrmalige Verwendung, also Wasser-Recycling, zu einer ökonomischen Notwendigkeit (Dalpke, 1999). Wasserkreisläufe findet man daher in fast allen Industriebranchen, wie der Papier-, der Lebensmittel-, der Bergbau-, der Kraftwerks- und der chemischen Industrie.

Ein weiterer wichtiger ökonomischer Grund für die mehrmalige Verwendung von Wasser in Produktionskreisläufen moderner Industriebetriebe sind die gestiegenen Kosten für Abwasser, das den Produktionsstandort verlässt. Für Direkteinleiter in den Vorfluter gelten dabei meist strengere Anforderungen als für Indirekteinleiter, die zunächst in eine Kläranlage einleiten. In dieser Kläranlage wird das Abwasser aufbereitet, um anschließend dem Vorfluter zugeführt zu werden (Brecht und Dalpke, 1980).

Die Charakterisierung von industriellen Wassersystemen wird in der Praxis im Allgemeinen durch chemische und physikalische Parameter realisiert. Suspendierte Mikroorganismen in der Wasserphase und vor allem vergesellschaftete Mikroorganismen auf Oberflächen, die man als Biofilme bezeichnet, beeinflussen jedoch ebenfalls die Wasserqualität von Industriebetrieben (Flemming, 1994).

Einer der Parameter zur Charakterisierung der Roh- und Abwasserqualität, ist die Menge der absetzbaren Feststoffe pro Liter Wasser (Imhoff und Imhoff, 1976; Koppe, 1979). Bei dieser Methode werden die innerhalb eines bestimmten Zeitraumes in einem Imhoff-Trichter sedimentierten Feststoffe volumetrisch quantifiziert. Damit erhält man eine Aussage über die Belastung des Wassers mit sedimentierbarem partikulärem Material (DIN 38409 H41, 1980).

Neben leicht sedimentierbaren Feststoffen gibt es noch weitere Feststoffe im Wasser, die mit der vorgenannten Methode nicht erfasst werden können. Im wässrigen Milieu bezeichnet man ungelöste Feststoffe ab einer Größenordnung von kleiner zehn Mikrometer Größe als kolloidal gelöste Teilchen oder Kolloide (Hahn, 1987; Bratby, 2006). Kolloide tragen, aufgrund von Hydroxyl-Gruppen an ihrer Oberfläche, meist eine negative Oberflächenladung, die in den meisten natürlichen Wässern in einer Größenordnung von 0,1 bis 1,0  $\mu\text{eq mg}^{-1}$  liegt (Stumm und Morgan, 1962; Thurmann, 1985). Aufgrund dieser gleichartigen negativen Ladungen stoßen sich die Kolloide voneinander ab und bleiben wegen ihrer geringen Größe und Abstoßung einzeln im Wasser in der Schwebe, (Hancke und Wilhelm, 2003; Bratby, 2006).

Bei den Kolloiden kann es sich um sehr verschiedene Stoffe oder um Mikroorganismen handeln. Kolloide können anorganische Verbindungen sein, wie z. B. Eisenoxidhydrate, Silikate oder Gips- bzw. Tonpartikel (Buffle und Leppard, 1995; Wiesner und Klute, 1997; Bache und Gregory, 2007). Beispiele für Kolloide, die aus organische Verbindungen bestehen sind: Harzpartikel, Huminstoffe, Lignine, Fette und Öle (Thurmann, 1985; Croue et al., 1999; Bache und Gregory, 2007). Neben den anorganischen und organischen Verbindungen werden auch Mikroorganismen, einzeln suspendiert oder in Form von kleineren Agglomeraten aufgrund ihrer Größe von 0,5 – 10,0 µm zu den Kolloiden gezählt (Bratby, 2006).

Zur Quantifizierung der Belastung des Wassers mit Kolloiden wird meist die Trübungsmessung verwendet. Dies ist eine optische Methode, bei der die Lichtstreuung an den Kolloiden als Messprinzip verwendet wird (DIN EN ISO 7027, 2000). Das Ergebnis wird in Trübungseinheiten Formazin angegeben. Als Einheit für die Trübung sind verschiedene Schreibweisen in der Literatur gängig, die alle gleichbedeutend sind: 1 TE/F = 1 FNU = 1 FTU (Trübungseinheiten Formazin). Bei der Untersuchung von kolloidalen organischen Substanzen im Wasser wird auch der spektrale Absorptionskoeffizient (SAK) bei einer definierten Wellenlänge mit einem Spektralphotometer verwendet (DIN 38404-3, 2005). Bei 254 nm absorbieren Kohlenstoff-Doppelbindungen (-C=C-) in organischen Molekülen das eingestrahlte UV-Licht und lassen damit einen Rückschluss auf die Belastung des Wassers mit organischen Substanzen zu (Bratby, 2006; Mania und Jekel, 2006).

Eine Maßnahme, um kolloidale Teilchen aus dem Wasser zu entfernen und somit die Wasserqualität zu verbessern, ist die so genannte Flockung. Dieser Reinigungsprozess basiert auf dem chemisch-physikalischen Prinzip der Koagulation und Flokkulation (Bratby, 2006; Bache und Gregory, 2007).

Bei dem ersten Teilschritt der Flockung, der Koagulation, kommt es zur Ausbildung einer Mikroflocke. Dabei werden kolloidale Teilchen mit gleicher oder ähnlicher negativer Oberflächenladung durch kationische Ladungsträger mit hoher Ladungsdichte so entstabilisiert, dass sie sich zu kleinen Agglomeraten zusammenlagern, welche man als Mikroflocken bezeichnet (Abbildung 1.1).

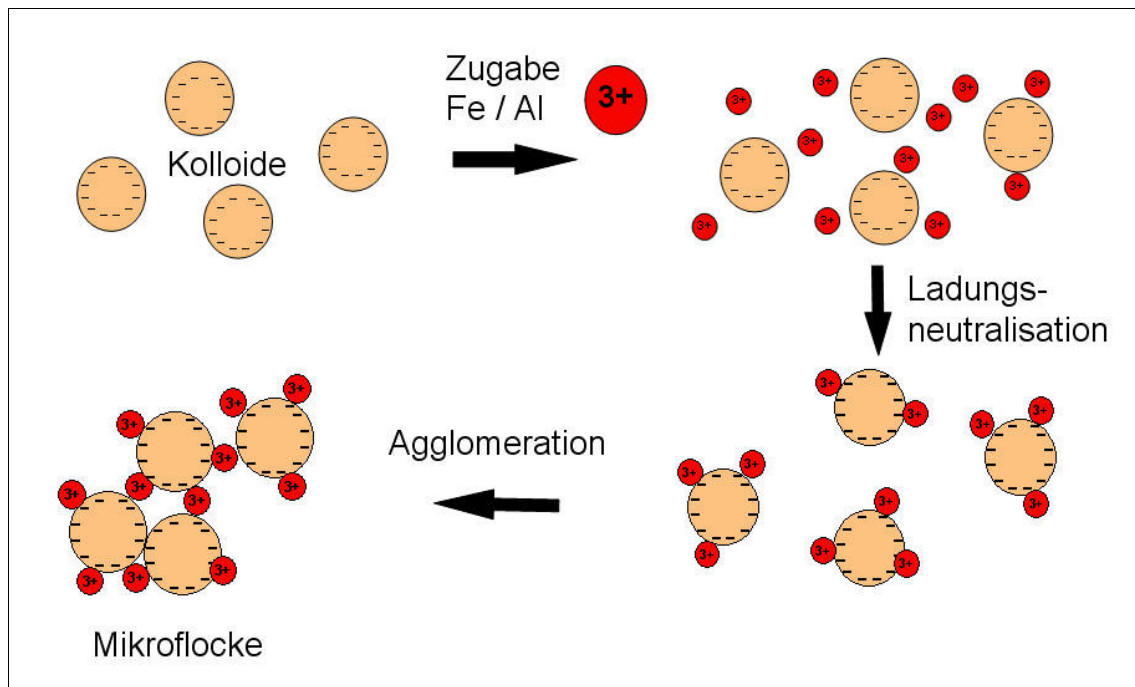


Abbildung 1.1: Koagulation: Entstabilisierung von Kolloiden durch dreiwertige Metall-Ionen und anschließende Mikroflockenbildung.

Mikroflocken sind im Gegensatz zu einzelnen Kolloiden visuell mit bloßem Auge erkennbar. Sie liegen in der Größenordnung von 0,1 – 2,0 mm. In der Praxis der Wasseraufbereitung kommen für diesen Prozess überwiegend dreiwertige Aluminium- oder Eisensalzlösungen mit unterschiedlichen chemischen Zusammensetzungen als Koagulant zum Einsatz (Bratby, 2006). Eine Übersicht über diese Metallsalzlösungen ist in Tabelle 1.1 gegeben.

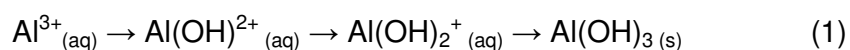
Tabelle 1.1: Übersicht kommerzieller Metallsalzlösungen, die in der Praxis als Koagulant Verwendung finden. Angaben für Aluminium, Chlorid und Sulfat in g/L. Die Basizität ist der prozentuale Anteil an Hydroxid-Ionen an den Gesamt-Anionen, die dem Metall-Kation in der Metallsalzlösung stöchiometrisch entsprechen. (Quelle: Technische Datenblätter verschiedener Hersteller von kommerziellen Metallsalzlösungen).

Metallsalzlösung	Aluminium bzw. Eisen [g/L]	Chlorid [g/L]	Sulfat [g/L]	Basizität [%]
FeCl <sub>3</sub> -Lösung	138	262	0	0
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> -Lösung	120	0	320	0
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> -Lösung	40	0	220	0
AlCl <sub>3</sub> -Lösung	60	230	0	0
PAC <sup>1)</sup>	89	220	0	46
PACS <sup>2)</sup>	54	100	30	46

1) PAC, Polyaluminiumchlorid

2) PACS, Polyaluminiumchloridsulfat

Sobald die konzentrierte Metallsalzlösung mit Wasser in Kontakt kommt, beginnt die Hydrolyse der dreiwertigen Eisen- oder Aluminiumionen. Dies ist schematisch am Beispiel von Aluminium in der folgenden Gleichung dargestellt:



Als Endprodukt bildet sich im pH-Bereich zwischen pH 5 und pH 8 überwiegend festes gelartiges Aluminiumhydroxid mit einer geringen Löslichkeit in Wasser (Fan et al., 2003). Wird der pH-Wert weiter angehoben, kann Aluminium jedoch in Form des Aluminat-Ions  $[\text{Al}(\text{OH})_4]^{-}$  in Lösung gehen (Holleman et al., 1985; Gregory und Duan, 2001). Aufgrund des amphoteren Verhaltens von Aluminium in wässriger Lösung geht es auch bei stark sauren pH-Werten unterhalb von pH 5 als  $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$  in Lösung (Holleman et al., 1985; Riedel, 1989). Wegen dieser Eigenschaft ist der pH-Wert während der Flockung mit Aluminiumsalzlösungen von großer Bedeutung. Im industriellen Bereich kann das amphotere Verhalten von Aluminium zu Problemen führen, wenn zunächst sauer oder alkalisch geflockt wird und damit Aluminiumionen in Lösung gehen. Wird danach der pH-Wert wieder auf den neutralen Bereich eingestellt, können die zuvor gelösten Aluminiumionen wieder hydrolysieren und es bildet sich Aluminiumhydroxid, welches als Feststoff an unerwünschten Stellen ausfallen kann (Bratby, 2006).

Metallsalzlösungen, die bereits bei ihrer Herstellung vorhydrolysiert werden, weisen einen höheren Gehalt an Hydroxid-Ionen auf. Innerhalb der Metallsalzlösung bilden sich dabei mehrkernige Aluminiumkomplexe aus. Der stabilste und für die Koagulation bedeutendste Aluminium-Komplex ist  $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{7+}$  (Parthasarathy und Buffle, 1985; Bertsch et al., 1986; Jiang, 2001). Aufgrund der höheren Basizität durch die enthaltenen Hydroxid-Ionen haben solche vorhydrolysierten Metallsalzlösungen einen geringeren Einfluss auf den pH-Wert des behandelten Wassers und sind effektiver bei der Wassereinigung (Gregory und Dupont, 2001; Fan et al., 2003).

Die bei der Koagulation gebildeten Mikroflocken bestehen aus einer Matrix von entstabilisierten Kolloiden und gelartigem Aluminiumhydroxid. Aber nicht nur entstabilisierte Kolloide werden durch Flockung aus dem Wasser entfernt. Während der Bildung der Mikroflocken können auch Partikel oder Makromoleküle in die Flockenmatrix aus Aluminiumhydroxid eingeschlossen werden. Man bezeichnet diesen Vorgang als Einschlußflockung. Weiterhin ist es möglich, Partikel oder Makromoleküle durch Adsorption an der Flockenoberfläche zu binden (Pernitsky, 2003; Bratby, 2006). Eine solche Mikroflocke ist schematisch in Abbildung 1.2 dargestellt.

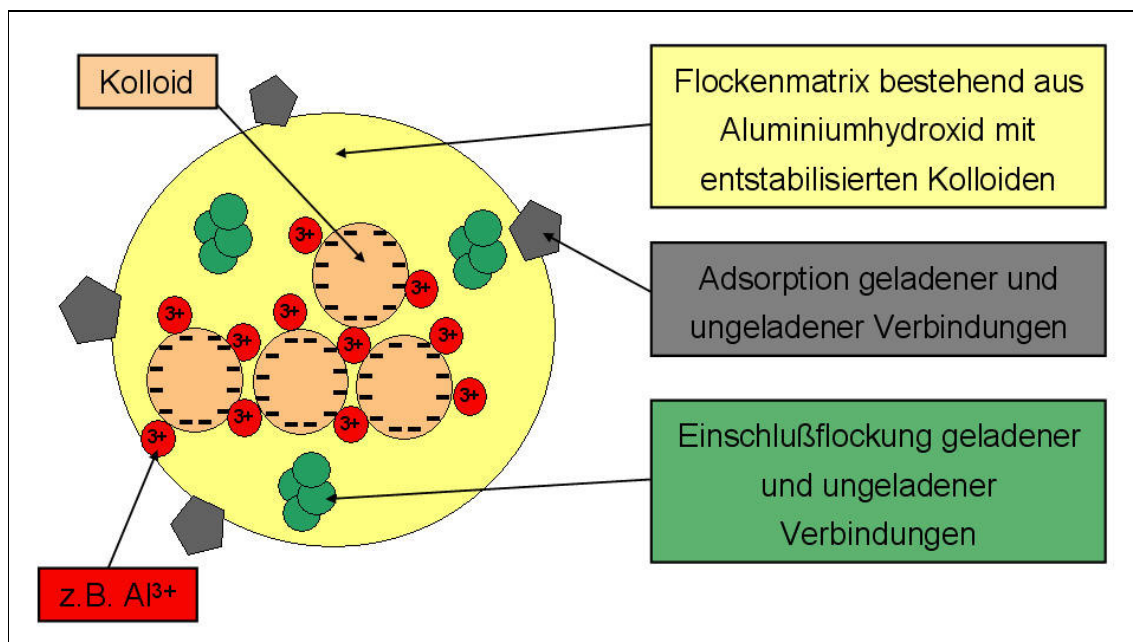


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung einer Mikroflocke mit entstabilisierten Kolloiden und weiteren möglichen Bestandteilen (nicht maßstabsgerecht).



Ein Problem der gebildeten Mikrofloken ist ihre hohe Instabilität gegenüber mechanischen Beanspruchungen wie Turbulenzen oder Strömungen. Die Mikrofloken zerfallen leicht und sind oft nicht stabil genug, um sich von der Wasserphase mechanisch / physikalisch abtrennen zu lassen. Deshalb werden beim zweiten Schritt der Flockung, der so genannten Flokkulation, Flockungshilfsmittel (FHM) eingesetzt. Die Flockungshilfsmittel bewirken über Brückenbildung bzw. Adsorption eine weitere Agglomeration der Mikrofloken zu größeren Agglomeraten, die man Makrofloken nennt. Dabei nimmt zum einen die Flockengröße deutlich zu ( $> 2 \text{ mm}$ ) und zum anderen werden die Bindungen innerhalb der Makroflocke deutlich stabiler (Michaels, 1954; Healy und Mer, 1962; Kasper, 1971; Gregory, 1973). Veranschaulicht wird dieser Prozess in Abbildung 1.3.

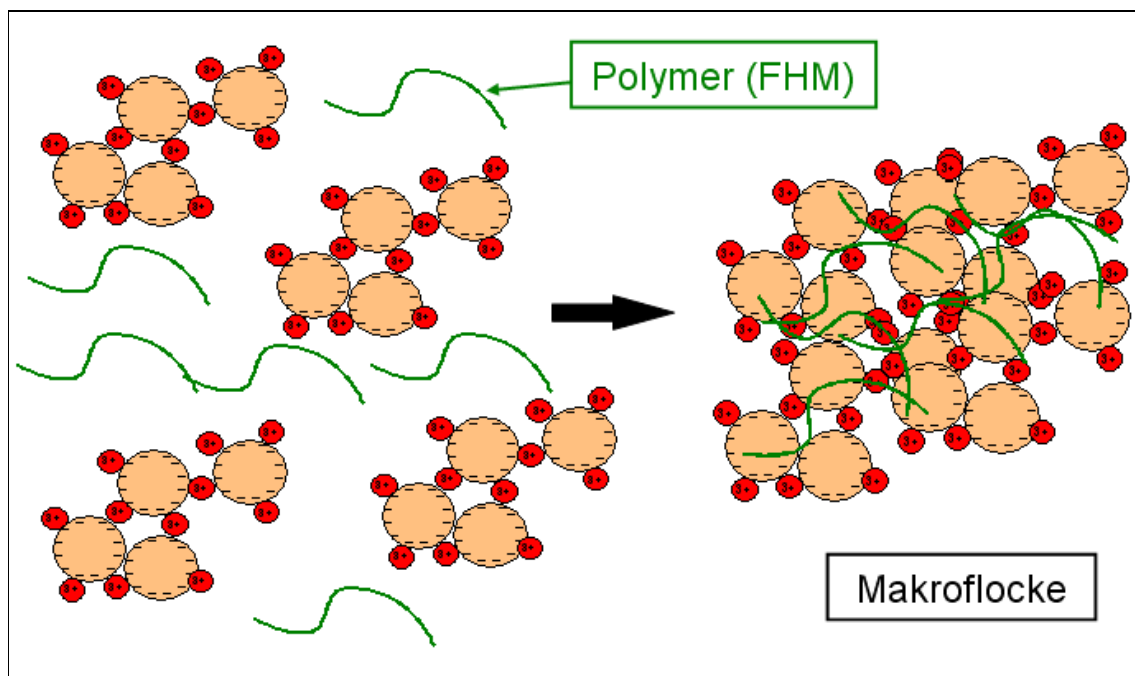


Abbildung 1.3: Agglomeration der Mikrofloken zu Makrofloken durch Flokkulation mit einem Flockungshilfsmittel (FHM).

Makrofloken sind mit einer Größe von 2 bis 10 Millimeter visuell mit bloßem Auge gut erkennbar und lassen sich deutlich leichter mechanisch / physikalisch vom Wasser abtrennen, als die kleineren Mikrofloken. Aufgrund ihrer größeren Stabilität können sie z. B. in mechanischen Pressen abgetrennt oder auch abzentrifugiert werden (Bratby, 2006; Bache und Gregory, 2007).

Bei den verwendeten Flockungshilfsmitteln für die Ausbildung von Makrofloken handelt es sich meist um organische Polymerverbindungen mit hohen Molekülmassen von  $200.000 - 20.000.000 \text{ g/mol}$  auf Basis von Polyacrylamid (PAM), (Abbildung 1.4).

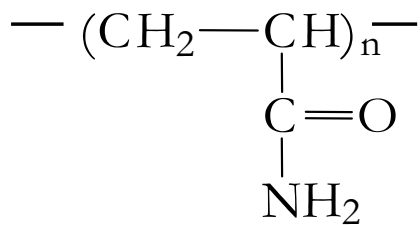


Abbildung 1.4: Monomer eines Polyacrylamid-Moleküls ( $n = 250 \dots 300.000$ ).

Polyacrylamide können für eine optimale Abstimmung auf die Mikrofloccen entweder anionisch oder kationisch modifiziert werden. In Abbildung 1.5 ist eine anionische Modifikation durch Reaktion von Acrylamid mit Acrylsäure dargestellt (Bratby, 2006).

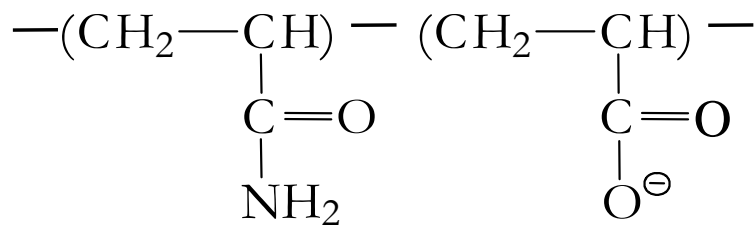


Abbildung 1.5: Anionisches Polyacrylamid-Monomer.

Als kationische Modifikation werden meist quaternäre Ammoniumverbindungen eingesetzt. In Abbildung 1.6 ist z. B. ein Ester der Acrylsäure mit einer quaternären Ammoniumgruppe verwendet worden.

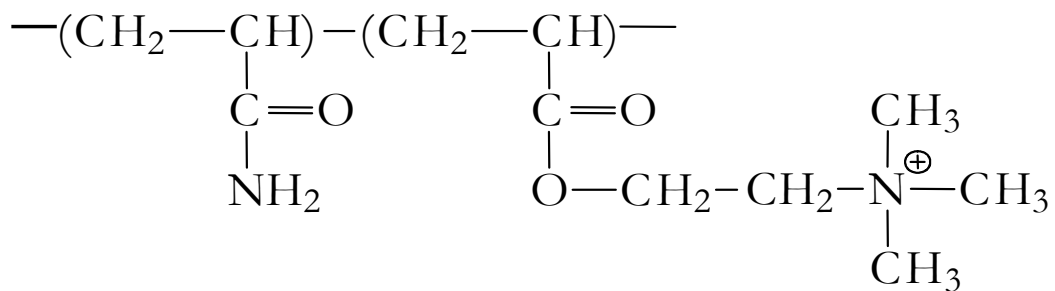


Abbildung 1.6: Kationisches Polyacrylamid-Monomer.

Neben den hier genannten anionischen und kationischen Modifikationen gibt es auch die Möglichkeit zur Copolymerisation mit anderen polymeren Verbindungen (Bratby, 2006).

Aufgrund der vorhandenen Variablen bei den Polyelektrolyten wie Polymertyp, Ladung, Ladungsdichte, Molmasse und Vernetzungsgrad ist es möglich, für jede

Anwendung bzw. jede Mikroflocke eine optimale Wechselwirkung zwischen Polyelektrolytmolekülen und Mikroflocken herzustellen und damit das optimale Flockungshilfsmittel für die Makroflocken im Hinblick auf Flockengröße und Flockenstabilität zu finden (Packham, 1967; Gosh et al., 1985; Pelzer und Künzel, 2006). Niedermolekulare Polymere mit hoher Ladungsdichte können sogar wie die weiter oben beschriebenen Metallsalzlösungen als Koagulant zur Mikroflockenbildung eingesetzt werden (Letterman und Pero, 1988).

Nach erfolgter Flockung gibt es prinzipiell drei unterschiedliche Methoden die Flocken vom Wasser abzutrennen (Hahn, 1987; Bache und Gregory, 2007):

- Sedimentation (Absinken der Flocken durch höhere Dichte)
- Flotation (Auftrieb der Flocken durch eingelagerte Luftblasen)
- Filtration (Zurückhalten der Flocken an oder auf einem Filtermaterial)

Die in diesem Kapitel beschriebene Flockung durch Metallsalzlösungen wird jedoch nicht nur zur Aufbereitung von Wasser und Abwasser verwendet, sondern es gibt auch Anwendungsmöglichkeiten direkt in der industriellen Produktion, insbesondere bei der Papiererzeugung (Faber und Vollmuth, 2007).

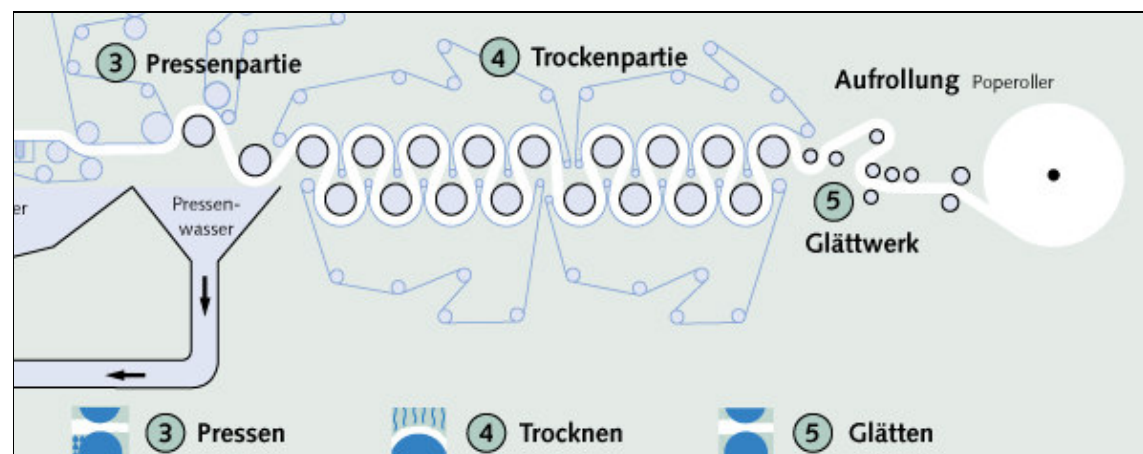
### **1.3 Industrielle Papierherstellung**

Bei der Herstellung von Papier ist Wasser ein unverzichtbarer Bestandteil des Produktionsprozesses. Denn nur in einem verdünnten Wasser / Fasergemisch können sich die natürlichen Zellstofffasern bei der Entwässerung auf der Papiermaschine zu einem zusammenhängenden Faservlies verbinden. Dabei erfüllt das Wasser noch weitere wichtige Aufgaben wie den Transport der Faserstoffe innerhalb des Produktionsprozesses, das Auflösen von Altpapier bzw. Zellstoff und es wird in Form von Dampf für das Beheizen der Trockenzylinder in der Trockenpartie benötigt (Brecht und Dalpke, 1980).

Die Erzeugung von Papier beginnt in der so genannten Stoffzentrale, wo trockene Zellstofffasern zum ersten Mal mit Wasser in Kontakt kommen. Das Wasser-Fasergemisch wird über Reinigungsaggregate wie Cleaner und Sortierer geführt, um Nichtfasermaterial und Faserbündel abzutrennen. Man strebt an, eine möglichst reine Mischung aus einzelnen Fasern und Wasser zu erhalten, die keine Fremdstoffe oder Agglomerate mehr enthält, die den Produktionsprozess oder die Qualität des Endproduktes negativ beeinflussen würden. Durch Rohrleitungen und großvolumige Behälter, die von den Papiermachern „Bütten“ genannt werden, gelangt das Wasser-

Das Diagramm zeigt den Prozess der Papierherstellung in einer Papiermaschine. Der Prozess beginnt mit der **Stoffzentrale**, in die Rohstoffe eingebracht werden. Der Pulpelösungsstrom fließt zum **Sortierer** (Zentrifugal-, Loch- oder Schlitz-Sortierer). Von dort geht der Pulpelösungsstrom zum **Stoffauflauf** (1) über. Im Stoffauflauf wird das Wasser teilweise abgetrennt. Der Pulpelösungsstrom fließt dann zur **Siebpartie** (2), wo das Wasser weiter abgetrennt wird. Der Pulpelösungsstrom fließt dann zum **Entwässern** (3), wo das Wasser weiter abgetrennt wird. Der Pulpelösungsstrom fließt dann zum **Stofffänger**, der den Pulpelösungsstrom in den Kreislauf zurückführt. Der Kreislaufwasser zur Stoffaufbereitung fließt zurück zur Stoffaufbereitung. Der Wasserstrom zum Sortierer fließt zum Sortierer. Der Wasserstrom zum Stoffauflauf fließt zum Stoffauflauf. Der Wasserstrom zur Siebpartie fließt zur Siebpartie. Der Wasserstrom zum Entwässern fließt zum Entwässern. Der Wasserstrom zum Stofffänger fließt zum Stofffänger. Der Wasserstrom zur Reinigungsanlage fließt zur Reinigungsanlage.

Am Stoffauflauf, wo die Fasersuspension auf ein Sieb aufgetragen wird, kann sich erstmals ein Faservlies ausbilden. Während der vorderen Siebpartie wird das Faservlies zunächst statisch und im hinteren Bereich der Siebpartie dann durch Vakuum-Sauger entwässert (Abbildung 1.7). In der anschließenden Pressenpartie hat das Faservlies auf den meisten Papiermaschinen bereits mehr als 50 % des ursprünglichen Wassergehaltes verloren und wird durch Zusammendrücken des Faservlieses weiter entwässert (Abbildung 1.8).



Nach der Pressenpartie erfolgt die weitergehende Entwässerung des Faservlieses in der so genannten Trockenpartie, wo die Papierbahn slalomartig über beheizte Trockenzylinder geführt wird. Am Ende dieses mehrstufigen Trocknungsprozesses

wird das fertige Papier mit einer Restfeuchte von meist < 5 % noch geglättet und anschließend aufgerollt.

Prinzipiell ist die Papierherstellung, wie in der Siebpartie von Abbildung 1.7 ersichtlich, ein Filtrationsprozess, bei dem eine feste Phase von einer flüssigen Phase abgetrennt wird. Die kleineren Bestandteile der festen Phase müssen durch chemische oder physikalische Wechselwirkungen mit den Zellstofffasern im Faservlies zurückgehalten werden, da ihre Dimensionen kleiner als die Öffnungen des Siebes bzw. des Faservlieses sind (Linhart, 1989). Die Größenverhältnisse der bei der Papierherstellung beteiligten Stoffe und eine Auswahl der zugesetzten chemischen Additive sind im Vergleich zur Dimension einer Siebmasche, wie sie in einem Sieb einer Papiermaschine vorhanden ist, in Abbildung 1.9 schematisch dargestellt.

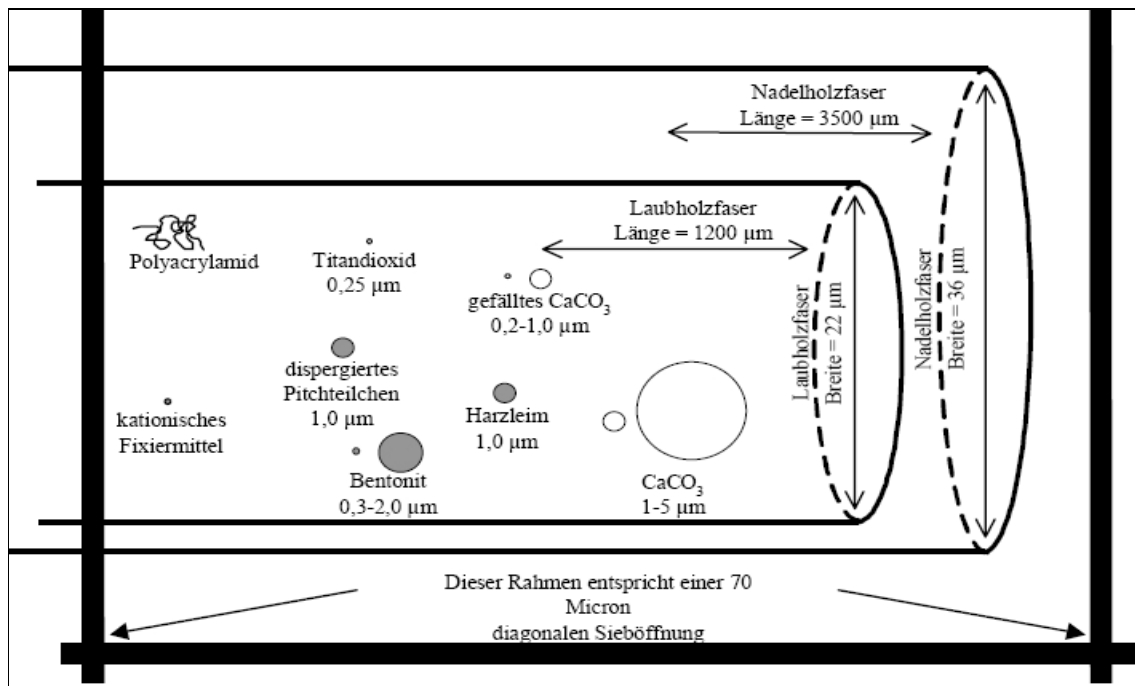


Abbildung 1.9: Größenvergleich von Papierinhaltsstoffen mit der Öffnung eines Papiermaschinensiebes. Polyacrylamid nicht maßstabsgerecht gezeichnet (Kahl, 1997).

## 1.4 Einsatz von Aluminiumsalzlösungen in der papiererzeugenden Industrie

Den Wasserkreisläufen der papiererzeugenden Industrie werden zahlreiche chemische Additive zugesetzt, um den Produktionsablauf oder die Eigenschaften des produzierten Papiers zu optimieren (siehe Abbildung 1.9) (Linhart, 1989; Kleemann, 2006). Ohne diese chemischen Zusätze wären die geforderten Papiermengen und Papierqualitäten auf der Welt nicht herstellbar. Auch würde die Umweltbelastung durch die Papierfabriken deutlich zunehmen, wenn man komplett auf den Einsatz chemischer Additive verzichten würde. Denn durch ihre Verwendung kann die Effizienz bei der Ausnutzung von Rohstoffen deutlich verbessert werden. Die Zugabe von bestimmten Additiven kann die Produktivität erhöhen und die Wiederverwertung von Altpapier und Ausschuss ermöglichen. Auf diese Weise kann der Rohstoffbedarf für die Produktion von Papier beim nur langsam nachwachsenden Holz gesenkt werden (Kleemann, 2006).

Generell unterscheidet man in der modernen Papierfabrikation zwei verschiedene Gruppen von chemischen Additiven. Wird eine Veränderung der Eigenschaften des Papiers angestrebt, so bezeichnet man die zugesetzten chemischen Additive als Funktionsadditive. Dagegen wird der Begriff Prozessadditive verwendet, wenn man durch den Additiveinsatz eine Optimierung des Produktionsablaufes beabsichtigt (Schneider, 2003; Kleemann, 2006).

Mit dem Einsatz von Aluminiumsalzlösungen lassen sich sowohl die Eigenschaften des Papiers als auch der Produktionsprozess optimieren. Aluminiumsalzlösungen, wie z. B. Aluminiumsulfat, das umgangssprachlich auch als „Alaun“ bezeichnet wird oder Polyaluminiumchlorid werden zur Leimung, und Störstoffbekämpfung sowie Fein- und Füllstofffixierung eingesetzt (Faber und Vollmuth, 2007). Der Gesamtumsatz von Aluminium-Produkten als Funktions- bzw. Prozessadditive in der Papierindustrie betrug weltweit im Jahr 2005 ca. 63 Millionen Euro bei einer Gesamtproduktion auf der Welt von 375 Millionen Tonnen Papier (Kleemann, 2006).

Bei der Leimung von Papier wird die Oberfläche oder auch die Masse des Papiers hydrophobiert. Dies geschieht mit dem Ziel, die Wasseraufnahme des geleimten Papiers innerhalb einen gewissen Zeitraums deutlich herabzusetzen. Dadurch wird das Papier unempfindlicher gegen Feuchtigkeit und Nässe. Als Leimungsmittel für die Papiermasse kann man Harzleime verwenden, die aufgrund ihrer anionische Ladung allerdings nicht von alleine auf die anionische Papierfaser aufziehen können. Erst mit Hilfe des kationischen Aluminium-Ions als Verbindungsglied lassen sich die Harzleimmoleküle auf die anionischen Papierfasern fixieren (Kaltenbach, 1960; Prinz und Schultz, 2006).

Neben den anionischen Harzleimen, gibt es auch direkt auf die Papierfaser aufziehende kationische Leime wie ASA (Alkenylbernsteinsäureanhydrid) und AKD (Alkylketendimer), die keine Aluminium-Ionen für die Leimfixierung benötigen (Haller und Lewing, 1995; Prinz und Schultz, 2006). Dennoch werden auch in diesen Anwendungsfällen Aluminiumsalzlösungen eingesetzt und zwar zur so genannten Störstoffbekämpfung bzw. Störstofffixierung (Faber und Vollmuth, 2007). Als Störstoffe bezeichnet man in der Papierherstellung gelöste und kolloidal gelöste anionische Oligomere und Polymere, sowie nichtionische Hydrokolloide, die den Prozess der Papierherstellung oder die geforderten Produkteigenschaften in negativer Weise beeinflussen (Eisenschmid und Stetter, 1998; Kleemann, 2006). Zu den Störstoffen, die man in Papierkreisläufen antrifft, zählen unter anderem Ligninderivate, Harzsäuren und andere Substanzen, die aus dem Papierrohstoff Holz stammen (Le et al., 2002). Aber auch Agglomerate und kolloidale Substanzen aus Fein- bzw. Füllstoffen und den Additiven, die verwendet wurden, können den Prozess der Papierherstellung stören (Eisenschmid und Stetter, 1998; Bos et al., 1999).

Die überwiegende Zahl an Störstoffen, die sich in Papierkreisläufen aufhalten, trägt eine anionische Ladung und kann mit kationischen Leimungsmitteln direkt reagieren und so die Leimungswirkung dieser chemischen Additive vermindern. Kationische Additive werden aber nicht nur direkt durch die anionischen Störstoffe negativ beeinflusst, sondern es kann durch Agglomeration mit weiteren Substanzen aus dem Wasserkreislauf zur Bildung von Agglomeraten kommen, die vom Papiermacher als Stickies bezeichnet werden. Gelangen diese Agglomerate in das Faservlies, kann dies zur Entstehung von Fehlstellen, Löchern oder Flecken im Papier führen. Flecken entstehen immer dann, wenn die Agglomerate eine andere Farbe haben, als das Papier selbst aufweist. Werden die im Faservlies vorhandenen Agglomerate allerdings aufgrund ihrer Klebrigkeit von den sich bewegenden Teilen der Papiermaschine aus dem Faservlies herausgerissen, so können Fehlstellen oder sogar Löcher im Papier entstehen und es kommt zur Bildung von Ablagerungen auf der Papiermaschine (Bos et al., 1999; Le et al., 2002; Künzel und Prinz, 2006).

Die Anwendung von Aluminiumsalzlösungen zur Störstofffixierung beruht darauf, nach dem oben in Kapitel 1.1 beschriebenen Prinzip der Mikroflocken-Bildung, die unerwünschte Störstofffracht im Wasserkreislauf der Papierfabrik zu reduzieren und damit die Wirkung der eingesetzten kationischen Additive wie AKD- oder ASA-Leim zu verbessern. Andere kationische Additive wie z. B. der Einsatz von Stärke zur Verbesserung der Papierfestigkeit werden auf die gleiche Weise unterstützt. Auch hier werden anionische Störstoffe, die mit der kationischen Stärke reagieren würden,

abgefangen und durch Fixierung an die Zellstofffasern unschädlich gemacht (Kohler et al., 1999; Faber und Vollmuth, 2007).

Neben der Störstoffbekämpfung, ist die Füllstofffixierung eine weitere Aufgabe von Aluminiumsalzlösungen bei der Herstellung von Papier. Füllstoffe sind meist anorganische Verbindungen, wie z. B. Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ), Kaolin, Talkum (Magnesium-Aluminium-Silikat) oder auch Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ). Durch den Einsatz von Füllstoffen kann die Oberfläche des Papiers und damit dessen Druckeigenschaften, wie z. B. das Verlaufen von Tinte, beeinflusst werden. Die Weiße, die Lichtundurchlässigkeit und speziell die Nass-Durchsicht von Papieren werden ebenfalls durch die Verwendung von Füllstoffen gesteuert (Bos et al., 1999). Aluminiumsalzlösungen tragen in diesen Anwendungen durch Mikrofloccenbildung und Fixierung der Füllstoffteilchen an die Papierfasern zu einer verbesserten Retention der Füllstoffe bei (Weigl, 1979; Kohler et al., 1999; Faber und Vollmuth, 2007).

Alle in diesem Kapitel beschriebenen Prozesse, die durch den Einsatz von Aluminiumsalzlösungen im Wasserkreislauf möglich sind, laufen stets gleichzeitig ab. Dosiermenge und Dosierort der Aluminiumsalzlösung an der Papiermaschine bestimmen, ob eher Störstoffe, Feinstoffe, Füllstoffe oder Leim auf die Papierfasern fixiert werden (Weigl, 1979; Kohler et al., 1999; Faber und Vollmuth, 2007).

### **1.5 Probleme bei der Verwendung von sauren Aluminiumsalzen in Wasserkreislaufsystemen**

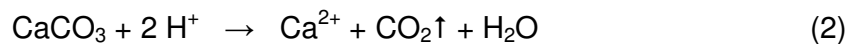
Nach der Zudosierung von Aluminiumsalzlösungen in den Wasserkreislauf von Industriebetrieben hydrolysiert das gelöste dreiwertige Aluminium-Kation, wie in Gleichung (1) beschrieben, zu ungelöstem Aluminiumhydroxid (Holleman et al., 1985). Aufgrund seiner Ladung lagert es sich an anionische Papierfasern an und wird über die Papierbahn aus dem Wasserkreislauf entfernt. Das Anion der eingesetzten Aluminiumsalzlösung, Sulfat bzw. Chlorid, verbleibt im Wasserkreislauf und reichert sich dort an. Abhängig von der zugesetzten Frischwassermenge, dem Maß der Kreislaufschließung und der zudosierte Menge der Aluminiumsalzlösung kommt es im Wasser zu einer erhöhten Konzentration des betreffenden Anions. Dies führt in Abhängigkeit von der verwendeten Aluminiumsalzlösung zu spezifischen Problemen in Wasserkreislaufsystemen von Industriebetrieben (Künzel und Le, 2003).



### 1.5.1 Probleme bei Verwendung von Aluminiumsulfat

In vielen Papierfabriken kommt es bei einem Einsatz von Aluminiumsulfat-Lösungen zu einer Anreicherung von Sulfat-Ionen im Wasserkreislauf. Hierbei werden Konzentrationen von bis zu 2.000 mg/L erreicht (Dietz et al., 2006). In komplett geschlossenen Kreisläufen werden diese Werte sogar noch überschritten und es kann zur Ausfällung von Calciumsulfat (Gips) kommen, wenn das Löslichkeitsprodukt überschritten wird (Gruber, 2006).

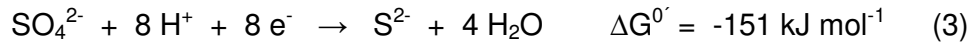
Verstärkt wird dieser Effekt noch durch den zunehmenden Einsatz von Calciumcarbonat (Kreide) als Füllstoff in der Papierindustrie. Durch die saure Aluminiumsulfatlösung kommt es lokal am Ort der Dosierung zu einem deutlich niedrigeren pH-Wert. Diese lokale pH-Wert-Absenkung kann zu einer Auflösung von Calciumcarbonat führen und die Konzentration an gelösten Calcium-Ionen steigt an, wie in Gleichung 2 dargestellt ist:



In Folge der in Gleichung 2 beschriebenen Erhöhung der Calcium-Ionen-Konzentration besteht in Verbindung mit hohen Sulfatgehalten die Gefahr von verstärkten Gips- und Calciumcarbonat-Ausfällungen und der Bildung von Ablagerungen in Rohrleitungen und Düsensystemen (Bobek et al., 2005).

Aufgrund der lokalen pH-Absenkung an der Dosierstelle der Aluminiumsulfatlösung kommt es, wie in Gleichung 2 ersichtlich ist, auch zur Bildung von gasförmigem Kohlendioxid. Dieses kann den Papierherstellungsprozess zum einen durch Schäumen stören und zum anderen durch Bildung von Pinholes (sehr kleine Löcher) im Papier das Endprodukt negativ beeinträchtigen (Kohler et al., 1999; Künzel und Prinz, 2006).

Die hohen Sulfatkonzentrationen, die durch einen Aluminiumsulfateinsatz verursacht werden, können im Wasserkreislauf noch weitere negative Folgen wie Schwefelwasserstoffbildung und Korrosion nach sich ziehen. Für die Bildung von Schwefelwasserstoff sind sulfatreduzierende Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* oder *Desulfobacter* verantwortlich (Bülow et al., 2003). Diese anaeroben Mikroorganismen reduzieren das im Wasser enthaltene Sulfat zu Sulfid, welches in Form von Schwefelwasserstoff ( $\text{H}_2\text{S}$ ) bei pH-Werten  $< \text{pH } 7$  aus dem Wasser ausgast oder in Verbindung mit Metallionen schwerlösliche Metallsulfide bildet (Gleichung 3 und 4) (Hamilton, 1985; Madigan und Martinko, 2006).



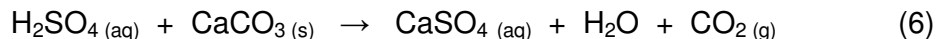
Falls z. B. Eisen-Ionen im Wasserkreislauf enthalten sind, kann die mikrobielle Sulfatreduktion anhand Gleichung 3 und 4 zur Bildung von schwarzem Eisensulfid führen. Gelangt dieses schwarze Eisensulfid in das Faservlies, wird die Papierqualität durch schwarze Stippen negativ beeinträchtigt (Klahre et al., 1996).

Schwefelwasserstoff ist jedoch nach seiner Entstehung bereits ein Problem, denn die Geruchsschwelle für das nach faulen Eiern riechende Gas liegt beim Menschen mit ca. 0,1 ppm (mg/m<sup>3</sup>) relativ niedrig. Deshalb kann es durch sulfatreduzierende Bakterien schnell zu einer Geruchsbelästigung in und um die Papierfabrik herum kommen. Bereits bei einer Überschreitung der zulässigen maximalen Arbeitsplatzkonzentration von 7 mg Schwefelwasserstoff pro m<sup>3</sup> Raumluft sind Maßnahmen zur Reduzierung des übel riechenden und in höheren Konzentrationen auch toxisch wirkenden Gases notwendig (DFG MAK-Liste, 2007).

Ein Folgeproblem der Schwefelwasserstoffbildung durch sulfatreduzierende Bakterien kann biogene Schwefelsäure-Korrosion sein. Schwefeloxidierende Mikroorganismen der Gattung *Thiobacillus* sind in der Lage Schwefelwasserstoff zu oxidieren und als Endprodukt entsteht im Biofilm Schwefelsäure, wie es in Gleichung 5 aufgezeigt ist (Prectl und Faulstich, 2006).



Durch die lokal im Biofilm in hoher Konzentration vorhandene Schwefelsäure werden besonders Bauteile aus Beton angegriffen (Lohaus und Petersen, 2006; Prectl und Faulstich, 2006). Die im Beton enthaltenen Calciumverbindungen wie CaCO<sub>3</sub> oder Ca(OH)<sub>2</sub> können durch Schwefelsäure aufgelöst werden, wie es in Gleichung 6 dargestellt ist (Rauch, 1984).



Neben der Betonkorrosion gibt es noch eine weitere Form der mikrobiell beeinflussten Korrosion (MIC), die beim Einsatz von Aluminiumsulfat auftreten kann. Dabei handelt es sich um die Korrosion von eisenbasierenden Werkstoffen und nichtrostenden Stählen durch sulfatreduzierende Bakterien (Hamilton, 1985; Little et al., 1992). Diese mikrobielle Werkstoffschädigung tritt meist in Form von Lochfraß auf und ist in Abbildung 1.10 schematisch dargestellt.

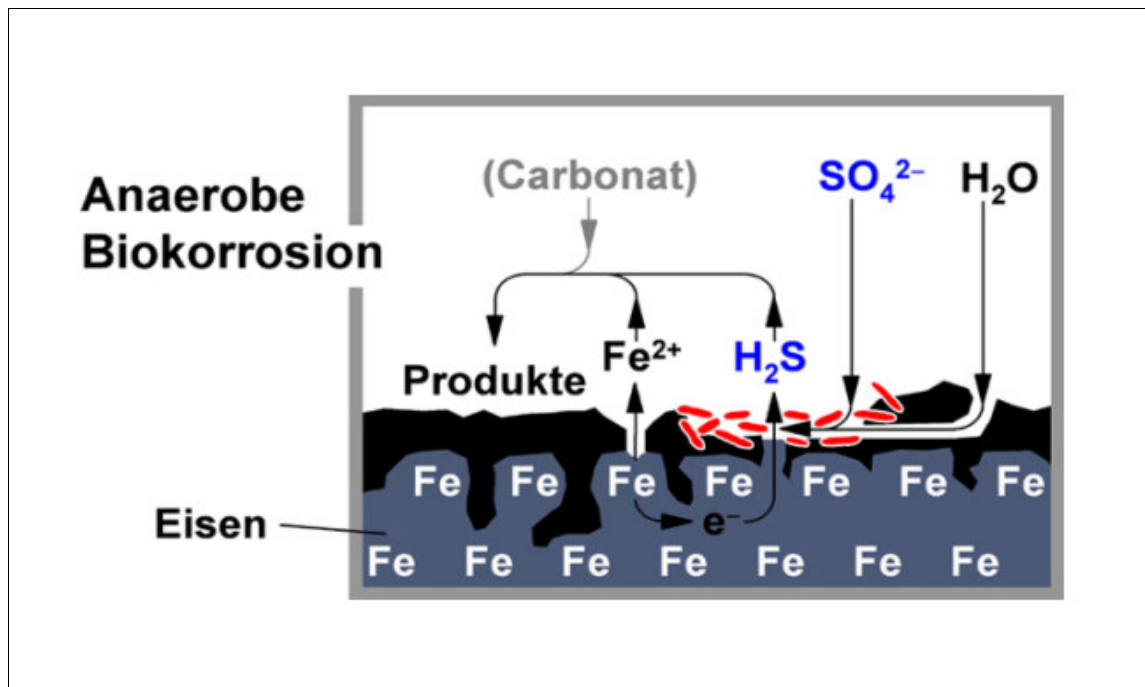
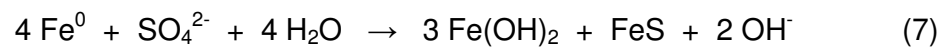


Abbildung 1.10: MIC durch sulfatreduzierende Bakterien (Dinh et al., 2004).

Auf eine noch nicht in allen Details geklärte Weise werden die Elektronen aus dem Stahl zur Reduktion von Sulfat verwendet. Der dabei entstehende Schwefelwasserstoff reagiert mit dem aus dem Werkstoff freigesetzten zweiwertigen Eisen zu schwarzem Eisensulfid, welches sich mit Carbonat aus dem Wasser vermischt und Krusten ausbildet (Dinh et al., 2004). Für die Summenreaktion der mikrobiell beeinflussten Korrosion durch sulfatreduzierende Bakterien lässt sich die folgende Reaktionsgleichung 7 formulieren (Heitz et al., 1996).



### **1.5.2 Probleme bei Verwendung von Aluminium(hydroxid)chlorid**

Wie beim zuvor beschriebenen Einsatz von Aluminiumsulfatlösung kommt es auch beim Einsatz von Aluminiumchlorid- oder Aluminiumhydroxidchloridlösungen (PAC) zu einer Anreicherung der Anionen im Wasserkreislauf. Hierbei werden in Abhängigkeit von der Dosiermenge der Aluminiumsalzlösung, der eingesetzten Frischwassermenge und dem Grad der Kreislaufschließung Chlorid-Konzentrationen von 100 mg/L bis zu 2000 mg/L erreicht (Bülow et al., 2003). Mit steigendem Chloridgehalt nimmt die Wahrscheinlichkeit von Korrosion stark zu, da in den meisten Fällen Bauteile aus den Edelstahltypen 1.4301 (früher als V2A bezeichnet) und 1.4571 (früher als V4A bezeichnet) im Wasserkreislauf von Industriebetrieben zum Einsatz kommen. Aufgrund der zu erwartenden Werkstoffschädigung ab einem Chloridgehalt von > 500 mg/L ist der Einsatz von Aluminiumchloridlösungen in hoch geschlossenen Wasserkreisläufen deshalb begrenzt (Dietz et al., 2006).

Ein weiteres Problem, das durch den hohen Chloridgehalt im Wasserkreislauf verursacht wird, liegt in der steigenden Salzfracht begründet, die mit dem Summenparameter Leitfähigkeit im System messbar ist. Durch vermehrte Wechselwirkungen der Ionen untereinander, werden die eingesetzten chemischen Additive in ihrer Wirkung beeinträchtigt. Zur Kompensation dieses negativen Einflusses ist dann ein Mehreinsatz des betreffenden Additivs notwendig.

Die Aufsalzung im Wasserkreislauf der Papierfabrik hat noch einen weiteren negativen Einfluss, der sich auf die Umwelt auswirkt. Denn die eingetragenen Salzmengen gelangen beim Ausschleusen aus dem industriellen Wasserkreislauf in das Gewässer und damit in den natürlichen Wasserkreislauf. Um Flüsse vor Folgeschäden, wie z. B. der Eutrophierung zu bewahren, gibt es vielfach Grenzwerte für Parameter wie Gesamt-Stickstoff, Phosphat, CSB und BSB. Grenzwerte für Anionen, die in nachgeschalteten Kläranlagen nicht biologisch abbaubar sind, wie z. B. Sulfat oder Chlorid, fehlen meist. Auf diese Weise gelangen die Salzmengen in die Umwelt und führen dort zu einer Erhöhung der Salzkonzentration im natürlichen Wasserkreislauf.

### 1.5.3 Einengung / Schließung von Wasserkreisläufen und Verwendung von Altpapier

Die weiter oben beschriebenen Probleme für den Einsatz von Aluminiumsalzlösungen verschärfen sich noch, wenn man die Entwicklung der letzten Jahrzehnte zur Einsparung von Frischwasser und Wiederverwendung von Produktionskreislaufwasser mit einbezieht, wie sie in Abbildung 1.11 veranschaulicht ist (Dalpke, 1999; Jung et al., 2006).

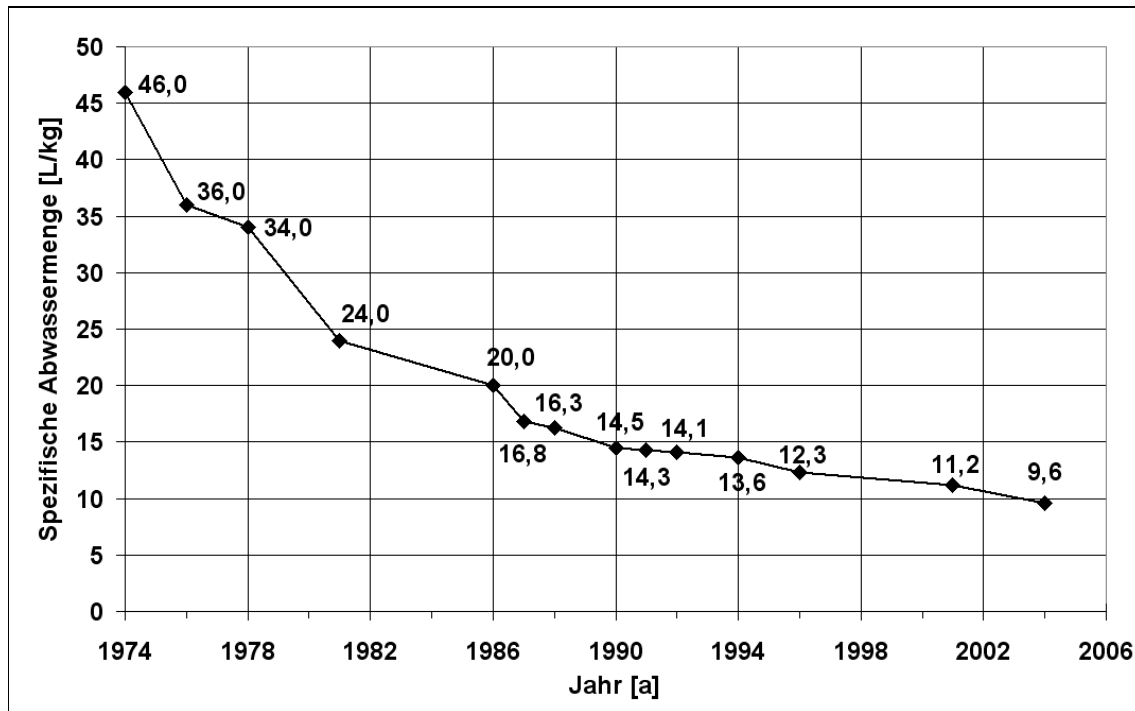


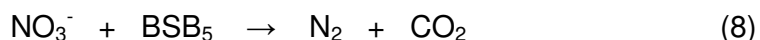
Abbildung 1.11: Entwicklung der mittleren spezifischen Abwassermenge in der deutschen Papierindustrie von 1974 bis 2004, verändert nach (Jung et al., 2006).

Durch die kontinuierliche Einengung von Wasserkreisläufen kommt es zu einer Anreicherung der ionischen Verbindungen und die Salzkonzentration im Wasserkreislauf steigt an. Auch der steigende Einsatz von Altpapier anstelle von sauberem Zellstoff führt dazu, dass die Wasserkreisläufe der Papierfabriken mehr mit Stör-, Fein- und Füllstoffen belastet werden und damit zusätzliche Additivmengen notwendig werden (Demel und Kappen, 1999; Zippel, 1999). Die zunehmende Weiterverarbeitung, Veredelung und das Streichen der Papiere sorgt ebenfalls für einen zusätzlichen Einsatz von chemischen Additiven bei der Papierherstellung. Werden diese Papiere dann später als Altpapier wieder in einer Papierfabrik als Rohstoff eingesetzt, bergen sie ein größeres Störstoffpotential als weniger veredelte oder weniger gestrichene Papiere (Geistbeck, 1999; Schmidt, 1999; Le et al., 2002).

#### 1.5.4 Möglicher Einsatz von Aluminiumnitrat

Aufgrund der oben beschriebenen Probleme, stößt man bei der Verwendung von Aluminiumsulfat- und Aluminiumchlorid- bzw. Aluminiumhydroxidchloridlösungen (PAC) an Grenzen für die Einsatzmengen dieser Produkte (Künzel und Le, 2003).

Eine mögliche Alternative zu den bislang verwendeten Aluminiumsalzlösungen stellen Produkte auf Aluminiumnitrat-Basis dar (Capdepon et al., 2002; Künzel und Le, 2003; Faber und Vollmuth, 2007). Wären diese Aluminiumnitrat-Lösungen ebenfalls erfolgreich einsetzbar zur Störstoff-, Feinstoff-, Füllstoff- und Leimfixierung, könnten sie für eine geringere Belastung des Wasserkreislaufes sorgen, denn durch biologische Nitratrefernung (Denitrifikation) könnte der durch den Produkteinsatz resultierende Nitratgehalt ( $\text{NO}_3^-$ ) direkt von den im Wasserkreislaufsystem der Papierfabrik enthaltenen Mikroorganismen zu Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) abgebaut werden. Zusammen mit mikrobiell verwertbaren Kohlenstoffverbindungen, hier ausgedrückt als  $\text{BSB}_5$ , könnte die Denitrifikation nach folgendem Schema ablaufen.



Als  $\text{BSB}_5$  bzw. Kohlenstoffquelle könnten in dieser Reaktion z. B. organische Säuren, Alkohole oder Kohlenhydrate verwendet werden.

Wäre der biologische Nitratabbau durch die Mikroorganismen sogar in einer ähnlichen Größenordnung wie die Nitratzugabe durch die Aluminiumnitrat-Lösung, so könnte eine Anreicherung der Nitrat-Ionen im Wasserkreislauf vermieden werden. Auf diese Weise könnte in einem industriellen Wasserkreislaufsystem die Aufsalzung durch den Einsatz einer solchen Aluminiumsalzlösung deutlich verringert oder eventuell sogar gestoppt werden. Dadurch könnte der Einsatz von chemischen Additiven gesenkt werden und die Umweltbelastung durch den Salzeintrag in die Gewässer würde sich verringern.

## 1.6 Biofilme

Um die Beteiligung von Mikroorganismen am biologischen Nitratabbau in industriellen Wasserkreislaufsystemen besser verstehen zu können, soll in diesem Kapitel zunächst auf die bevorzugte Lebensform von Mikroorganismen eingegangen werden. Neben einzeln in der Wasserphase suspendierten Bakterien, stellen vergesellschaftete Mikroorganismen, so genannte Biofilme die bevorzugte Lebensform von Mikroorganismen dar. Je nachdem, wo man sie in Wassersystemen antrifft, werden sie als Belag, Schleim, mikrobielle Matte, Sichelhaut, Schlamm oder Flocke bezeichnet (Flemming, 1991b; Wimpenny, 2000; Donlan, 2002; Flemming, 2008).

Gemeinsames Kennzeichen von Biofilmen ist dabei immer eine Aggregatbildung von Mikroorganismen in großer räumlicher Nähe zueinander. Biofilme bestehen aus Mikroorganismen und extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) in einer stark hydratisierten Matrix mit einem Wassergehalt von meist über 90 Prozent (Costerton et al., 1995; Wingender et al., 1999; Flemming et al., 2007). Ein Modell zur Veranschaulichung eines Biofilms ist in Abbildung 1.12 wiedergegeben.

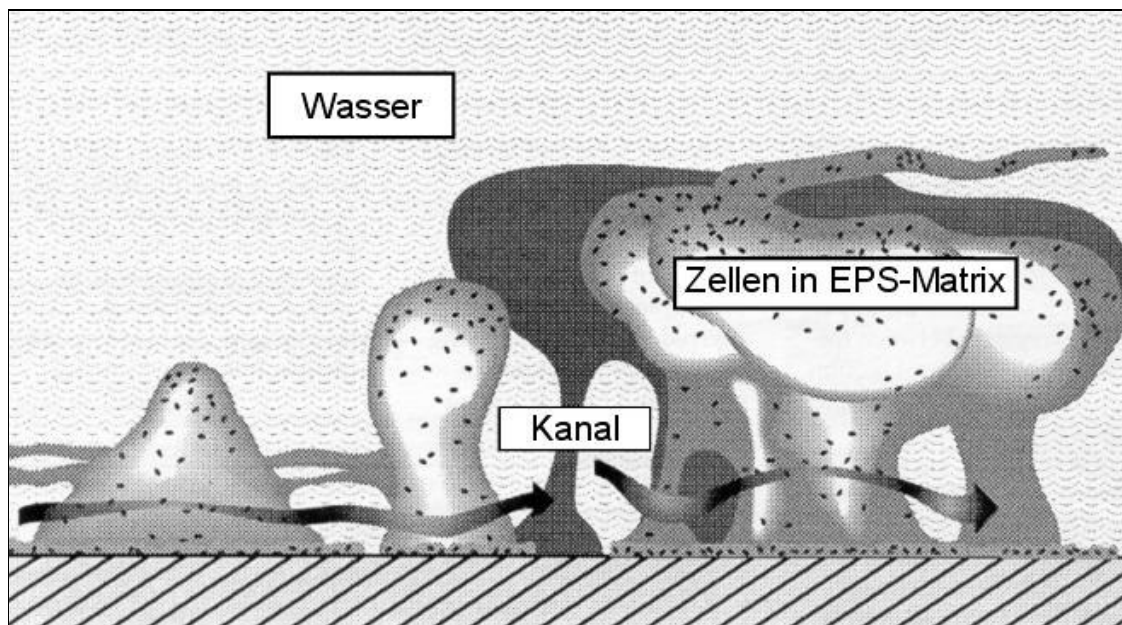


Abbildung 1.12: Modell eines Biofilms (verändert nach Costerton et al., 1994).

Während im suspendierten Zustand für die Mikroorganismen nur die Nährstoffe des umgebenden Mediums zur Verfügung stehen, bietet die Grenzfläche mit der Möglichkeit zur Adsorption von Makromolekülen eine deutlich bessere Nährstoffsituation. Auf diese Weise können Mikroorganismen in Biofilmen auch in

oligotrophen, also nährstoffarmen Systemen überleben (Stal und al., 1989; Donlan, 2002).

Biofilme findet man an den unterschiedlichsten Grenzflächen, wie fest-flüssig, flüssig-gasförmig und fest-gasförmig (Wimpenny, 2000). Sie siedeln auf abiotischen Materialien (z. B. metallische Werkstoffe, Kunststoffe, mineralische Untergründe oder Glas), genauso wie auf biotischen Aufwuchsflächen aus pflanzlichem, tierischem oder menschlichem Gewebe (Flemming, 1991a, 2008).

Die notwendigen Voraussetzungen für eine Biofilmbildung sind immer:

- eine Grenzfläche
- Mikroorganismen
- Nährstoffe
- Feuchtigkeit (Wasser, Luftfeuchtigkeit)

Biofilme und die darin ablaufenden mikrobiellen Stoffwechselprozesse hat man sich für zahlreiche technische Anwendungen zu Nutze gemacht. Beispielhaft seien an dieser Stelle Langsamsandfilter in der Trinkwasseraufbereitung, biologische Kläranlagen in der Abwasseraufbereitung und Bioreaktoren jedweder Art genannt (Wuertz et al., 2003; Gimbel et al., 2006).

Durch Biofilme können aber auch unerwünschte Beschädigungen an Werkstoffen (Biokorrosion) verursacht werden (Javaherdashti, 2008) oder z. B. thermische Prozesse auf Wärmetauschern in Form von Biofouling negativ beeinflusst werden (Flemming, 2008). Zu störenden Einflüssen kommt es ebenso in der Papierindustrie, wenn Teile des Biofilms sich von ihren Oberflächen ablösen, auf die Papiermaschine gelangen und dort einen Abriss der Papierbahn hervorrufen (Klahre et al., 1996).

Biofilme werden durch Parameter im System, wie Fließgeschwindigkeit, Nährstoffangebot, pH-Wert, Redoxpotential und Sauerstoffgehalt beeinflusst (Flemming, 1994). Bei guter Versorgung mit Nährstoffen und daraus resultierender hoher Wachstumsrate kann sich bei geringen Scherkräften ein dicker und rauer Biofilm ausbilden. In Wassersystemen mit hohen Scherkräften und somit hohen Abrasionsraten, bilden sich dünnere, aber dafür dichtere und relativ glatte Biofilme aus (Christensen und Characklis, 1990).

Da Biofilme eine Dicke von über 500 µm erreichen können, bilden sie Gradienten für Stoffkonzentrationen aus. Davon können z. B. der pH-Wert, das Redoxpotential, die



Sauerstoff-, Schwefelwasserstoff-, Ammonium-, Nitrit-, Nitrat-, Sulfatkonzentrationen oder andere Stoffkonzentrationen betroffen sein. Die Gradienten sind stets in vertikaler Richtung (Biofilmtiefe) und horizontaler Richtung (Fließrichtung des Wassers) ausgeprägt (Flemming, 1991b). In Abbildung 1.13 ist die Ausbildung von Gradienten schematisch dargestellt.

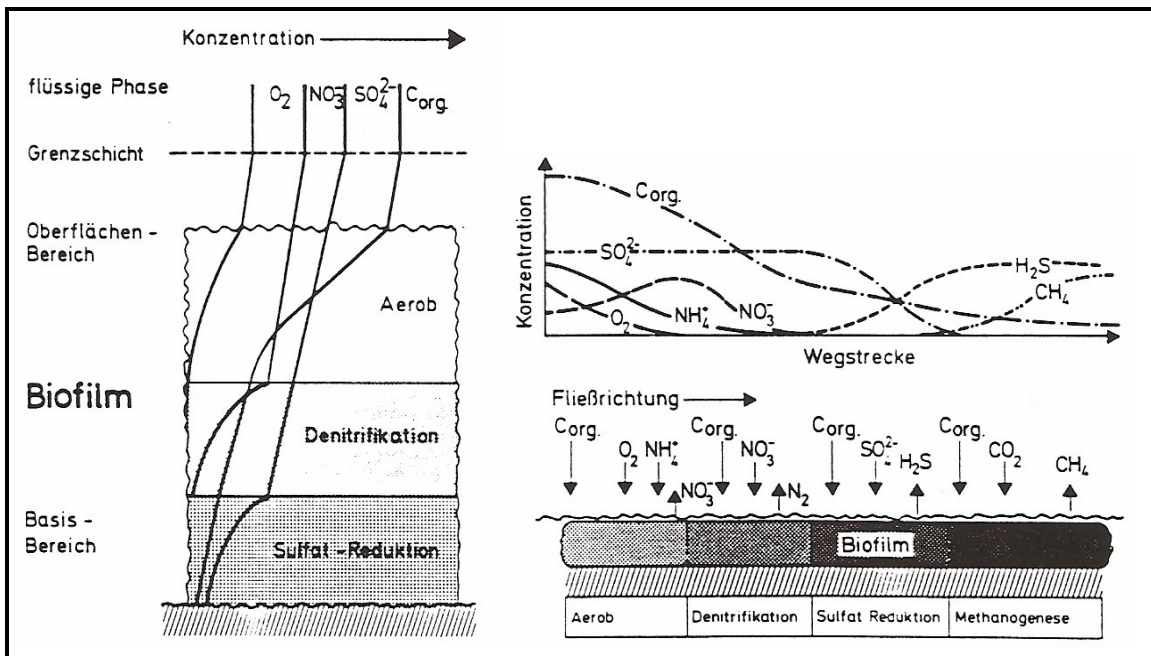


Abbildung 1.13 Vertikale und horizontale Ausbildung von Gradienten (Flemming, 1991b).

Biofilme findet man nicht nur auf festen Oberflächen, sondern sie kommen auch als planktonische Agglomerate vor. Ein intensiv untersuchtes Beispiel für diese Form von Biofilmen stellen Belebtschlammflocken in Kläranlagen dar. Genau wie auf festen Oberflächen können sich auch innerhalb einer Biofilm-Flocke unterschiedliche Stoffkonzentrationen ausbilden. In Abbildung 1.14 sind Ergebnisse von Mikrosensoruntersuchungen auf verschiedene Gase und Anionen in Belebtschlammflocken aus zwei unterschiedlichen Kläranlagen dargestellt (Santegoeds et al., 1998).

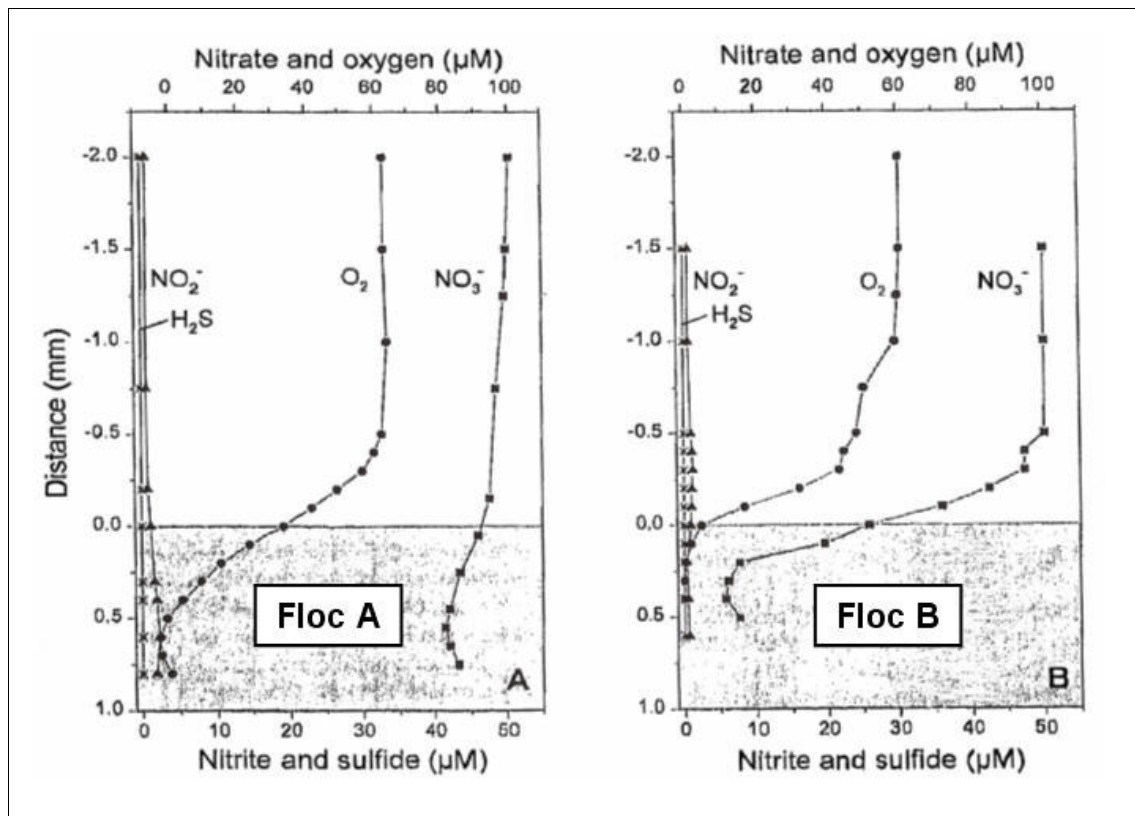


Abbildung 1.14: Mikrosensor-Profile von Nitrat, Nitrit, Sulfid und Sauerstoff von Belebtschlammflocken aus zwei unterschiedlichen Kläranlagen. Die Distanz 0 mm entspricht der Flockenoberfläche, verändert nach (Santegoeds et al., 1998).

Zwischen beiden Belebtschlammflocken zeigen sich dabei deutliche Unterschiede beim Sauerstoff- und Nitratgehalt. Bei der Flocke B ist bereits nach wenigen Mikrometern die Sauerstoffkonzentration in der Flocke auf Null gesunken, während bei der Flocke A auch bei einer Flockentiefe von 0,5 mm noch Sauerstoff vorhanden ist. Aufgrund dieser anoxischen Bedingungen in der Flocke B ist der mikrobielle Nitratabbau bevorzugt möglich. Deshalb werden innerhalb der Belebtschlammflocke B auch deutlich niedrigere Nitratkonzentrationen gemessen, als innerhalb der Flocke A.

In Kläranlagen kann mit Hilfe von Belebtschlamm, den man auch als „schwimmenden Biofilm“ bezeichnen könnte, in Abhängigkeit von der Belüftung, sowohl nitrifiziert als auch denitrifiziert werden (Mudrack und Kunst, 2003). Neben diesen beiden Umsetzungen von Stickstoffverbindungen gibt es noch weitere Stoffwechselprozesse an denen Verbindungen des Stickstoffs beteiligt sind, die im folgenden Kapitel „Stickstoffkreislauf“ erläutert werden.

## 1.7 Stickstoffkreislauf

Der Stickstoff ist eines der bedeutendsten Elemente in unserer Natur. Er kommt in verschiedenen Oxidationsstufen in unterschiedlichen Verbindungen vor. In der Atmosphäre ist elementarer Stickstoff ( $N_2$ ) zu zwei Dritteln als Stickstoff-Gas enthalten. Weitere wichtige ionische Stickstoffverbindungen im Redoxzyklus des Stickstoffs sind Ammonium ( $NH_4^+$ ), Nitrat ( $NO_3^-$ ) und Nitrit ( $NO_2^-$ ). Einige der wichtigsten Redoxreaktionen des Stickstoffs werden nahezu ausschließlich von Prokaryoten durchgeführt, also durch bakterielle Umsetzungen (Abbildung 1.15).

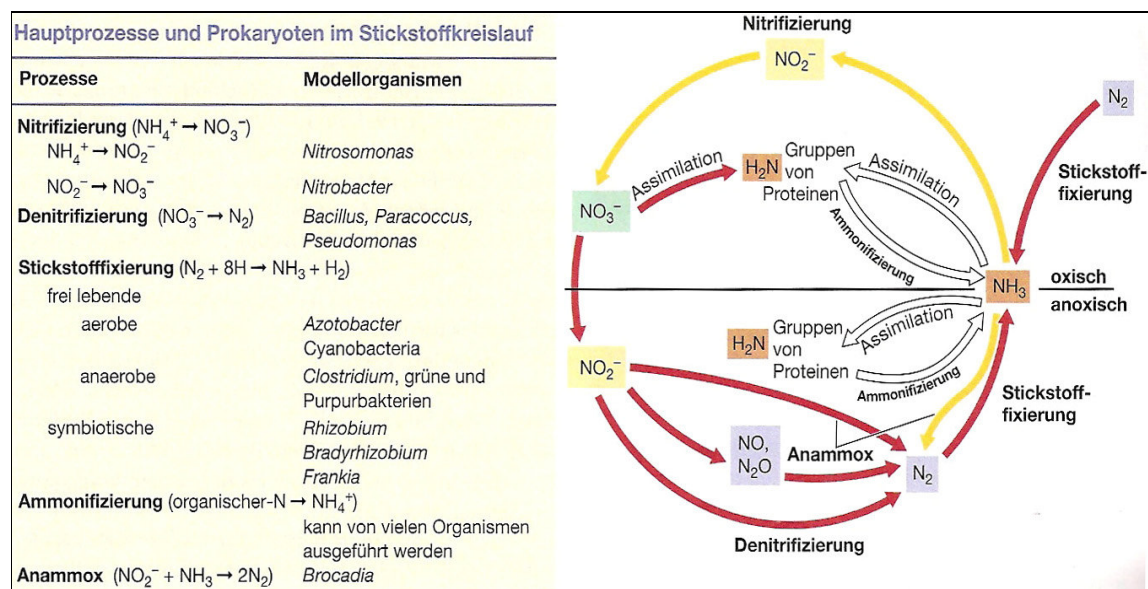


Abbildung 1.15: Redoxzyklus des Stickstoffs. Oxidationen werden durch gelbe Pfeile und Reduktionen durch rote dargestellt. Reaktionen ohne Änderung der Oxidationszahl des Stickstoffs sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet (Madigan und Martinko, 2006).

Stickstoffgas ( $N_2$ ) ist die stabilste Form des Stickstoffs und nur wenige Lebewesen, wie z. B. Leguminosen in der Rhizosphäre von Pflanzen, sind in der Lage diesen Stickstoff im Prozess der Stickstofffixierung zu verwerten. Neben der Stickstofffixierung sind die Nitrifikation und die Denitrifikation, die beiden bedeutendsten Stickstoff-Umsetzungen. Bei der Denitrifikation entsteht als Endprodukt immer eine gasförmige Stickstoffverbindung. Meist ist es Stickstoff ( $N_2$ ), aber auch Distickstoffmonoxid ( $N_2O$ ) kann als Endprodukt der Denitrifikation entstehen. Bei der Nitrifikation wird Ammoniak ( $NH_3$ ) bzw. das mit ihm im Gleichgewicht stehende und bei etwa neutralen pH-Werten auch dominierende Ammonium-Ion ( $NH_4^+$ ) aerob umgesetzt. Hierbei entsteht in einem ersten Schritt zunächst Nitrit und im zweiten Schritt, als Endprodukt der Nitrifikation, Nitrat. Auf beide Umsetzungen wird aufgrund der Bedeutung für diese Arbeit im Folgenden noch genauer eingegangen werden.

Ammonium kann nicht nur aerob über die Nitrifikation umgesetzt werden, sondern wird auch von einigen wenigen Mikroorganismen (z. B. *Brocardia*) unter anoxischen Bedingungen mit Nitrit als Elektronenakzeptor oxidiert (Abbildung 1.15). Man bezeichnet diesen Prozess als Anammox-Prozess, hergeleitet von Anaerobe Ammoniak-Oxidation. Als Endprodukt des Anammox-Prozesses entsteht Stickstoff (Jetten et al., 1998; Op den Camp et al., 2006) (Gleichung 9).



Alle bislang in diesem Kapitel beschriebenen Redoxreaktionen zählt man zum dissimilativen Stoffwechsel. Der dissimilative Stoffwechsel dient im Gegensatz zum assimilativen Stoffwechsel ausschließlich der Energieversorgung und Energiespeicherung der Bakterien, wie z. B. im anaeroben Atmungsstoffwechsel Nitrat als Elektronenakzeptor verwendet werden kann. Als Endprodukt des Energiestoffwechsels werden stets anorganische Verbindungen wie Nitrat, Nitrit oder Stickstoff gebildet.

Dagegen entstehen beim assimilativen Stoffwechsel von Bakterien immer organische Verbindungen, die Bestandteil der Zellmasse sind. Aus Ammoniumverbindungen können durch Assimilation beispielsweise organische Aminverbindungen ( $\text{R-NH}_2$ ) entstehen (Abbildung 1.15). Die assimilativen Stoffwechselprozesse sind für das Zellwachstum und die Zellvermehrung der Bakterien unbedingt notwendig, denn nur auf diese Weise werden bestimmte Substanzen für die Biosynthese bereitgestellt. Assimilative Umsetzungen finden deshalb sowohl unter oxischen als auch anoxischen Bedingungen statt (Abbildung 1.15).

Die beiden Stoffwechseltypen des assimilativen und dissimilativen Stoffwechsels unterscheiden sich auch hinsichtlich der umgesetzten Substratmengen voneinander. So wird beispielsweise bei der assimilativen Nitratreduktion nur soviel Nitrat umgesetzt, wie es den Bedürfnissen für Zellwachstum und Zellvermehrung entspricht, während bei der dissimilativen Nitratreduktion große Mengen Nitrat umgesetzt werden und anschließend gasförmige Stoffwechselendprodukte in die Umwelt abgegeben werden (Madigan und Martinko, 2006).

## 1.8 Denitrifikation

Anorganische Stickstoffverbindungen, wie Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) und Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) können durch mikrobielle Stoffwechselprozesse zu gasförmigen Stickstoffverbindungen wie Stickstoffmonoxid (NO), Distickstoffmonoxid ( $\text{N}_2\text{O}$ , „Lachgas“) und elementarem Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) reduziert werden. Dieser Prozess wird Denitrifikation genannt und ist bereits seit über einem Jahrhundert Gegenstand der Forschung (Knowles, 1982; Ye et al., 1994; Madigan und Martinko, 2006).

Die Denitrifikation ist aus verschiedenen Gründen von praktischem Interesse: Zum einen kommt es durch Düngung in der Landwirtschaft zu einer Akkumulation von Nitrat im Oberflächenwasser und auch im Grundwasser. Durch Denitrifikation wird der Nitratgehalt im Wasser gesenkt und damit kann die Eutrophierung von Gewässern begrenzt werden (Knowles, 1982). Zum anderen wird durch die Denitrifikation im oberen Erdreich pflanzenverwertbarer Nährstoff (Nitrat-Stickstoff) in nicht pflanzenverwertbaren gasförmigen Stickstoff umgewandelt, der aus dem Boden entweicht. Die Denitrifikation führt außerdem durch die Bildung von Stickoxiden ( $\text{NO}_x$ ) zu einer Veränderung der globalen Atmosphärenchemie und trägt damit auch zum Treibhauseffekt und zur Zerstörung der Ozonschicht bei (Philippot, 2005).

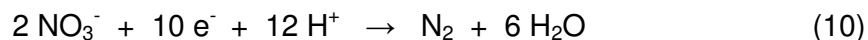
Kommt es bei der Nitratreduktion nicht zur Ausbildung von gasförmigen Stickstoffverbindungen, sondern das Nitrat wird nur zu Nitrit reduziert, spricht man nicht von Denitrifikation. Dies ist z. B. bei *Escherichia coli* der Fall (Madigan und Martinko, 2006). Eine Übersicht über den Ablauf der Denitrifikation mit allen beteiligten Zwischenprodukten, Oxidationsstufen und der am Abbau beteiligten Enzyme ist in Tabelle 1.2 zusammengestellt.

Tabelle 1.2: Übersicht über die dissimilative Nitratreduktion

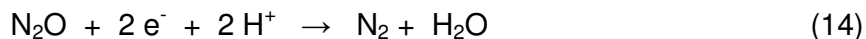
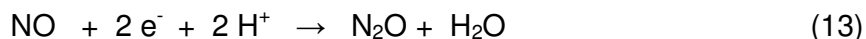
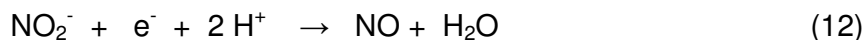
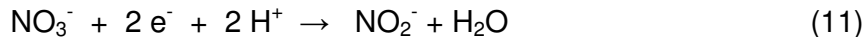
Stickstoff- Verbindung	Chemische Formel	Enzym	Oxidationsstufe des Stickstoffs
Nitrat	$\text{NO}_3^-$		+ 5
	↓	Nitratreduktase	
Nitrit	$\text{NO}_2^-$		+ 3
	↓	Nitritreduktase	
Stickstoffmonoxid	$\text{NO}$		+ 2
	↓	Stickstoffmonoxid- reduktase	
Distickstoffmonoxid	$\text{N}_2\text{O}$		+ 1
	↓	Distickstoffmonoxid- reduktase	
Stickstoff	$\text{N}_2$		0

Alle in der Tabelle 1.2 dargestellten Stickstoffverbindungen sind nachgewiesene Zwischenprodukte der Denitrifikation. Unter bestimmten Bedingungen kann es deswegen z. B. zu einer Anreicherung von Nitrit kommen (Wilderer et al., 1987). Ebenso kann die Denitrifikation auf der Stufe von Stickstoffmonoxid oder Distickstoffmonoxid beendet sein und deswegen kaum Stickstoff als Endprodukt der Denitrifikation gebildet werden (Ye et al., 1994).

Als Summenreaktion lässt sich für die vollständige dissimilative Reduktion von Nitrat folgende Reaktionsgleichung 10 formulieren. Der organische Elektronendonator (Kohlenstoffverbindung, wie z. B. Methanol, Ethanol oder Essigsäure), ist zur Vereinfachung der Reaktionsgleichungen nicht mit aufgeführt:

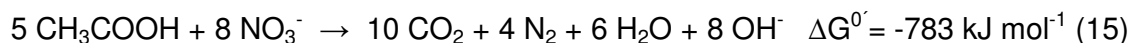


Für die Einzelschritte gilt:



An den Einzelreaktionen, wie auch an der Summengleichung (10) erkennt man, dass bei der Reaktion Protonen verbraucht werden und dadurch das Wasser alkalischer wird. In ungenügend gepufferten und stark nitrathaltigen Wassersystemen kann deshalb der pH-Wert deutlich ansteigen (z. B. von pH 7 auf pH 9).

Bei der Denitrifikation ist Nitrat der terminale Elektronenakzeptor und wird entweder heterotroph, mit organischen Kohlenstoffquellen wie z. B. Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) und Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) oder autotroph, mit anorganischen Kohlenstoffquellen wie Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) umgesetzt (Beauchamp et al., 1989; Madigan und Martinko, 2006). In aquatischen Systemen sind aufgrund der meist vorhandenen leicht abbaubaren Kohlenstoffverbindungen, ausgedrückt als CSB oder BSB<sub>5</sub>, überwiegend chemoorganotrophe und damit heterotrophe Mikroorganismen am biologischen Nitratabbau beteiligt. Bislang sind wenigstens 30 Bakteriengattungen bekannt, die vollständig denitrifizieren können (Tavares et al., 2006). Als Beispiel einer chemoorganotrophen Umsetzung ist in Gleichung 15 die Denitrifikation mit Acetat als Kohlenstoffquelle aufgeführt.



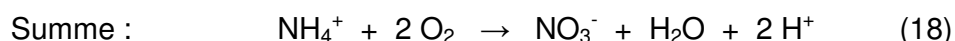
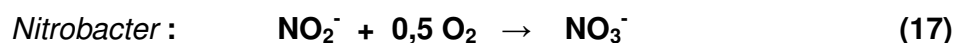
Die meisten isolierten denitrifizierenden Mikroorganismen sind ebenfalls in der Lage, Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor zu verwerten. Beide Stoffwechselprozesse stehen in ständigem Wettbewerb zueinander. Solange noch Sauerstoff vorhanden ist, wird die aerobe Atmung bevorzugt, da 10 % mehr Energie aus dem aeroben Stoffwechsel gewonnen werden kann (Mudrack und Kunst, 2003). Dennoch lässt das gemeinsame Vorkommen in Mikroorganismen auf eine enge evolutionsbedingte Verwandtschaft dieser beiden mikrobiellen Umsetzungen schließen. Aus diesem Grund wird die Denitrifikation (Nitratatmung) vielfach als Vorgänger der Sauerstoffatmung bezeichnet (Saraste und Castresana, 1994; Pinakoulaki et al., 2002).

Auch wenn die aerobe Nitratreduktion von Mikroorganismen mittlerweile nachgewiesen wurde, findet die Denitrifikation in den meisten Fällen unter anoxischen Bedingungen oder deutlich reduziertem Sauerstoffgehalt im Wasser statt ( $< 1 \text{ mg/L O}_2$ ) (Knowles, 1982). Aus diesem Grund sind Biofilme mit ihrem Konzentrationsgradienten für Sauerstoff prädestiniert für die dissimilative Reduktion von Nitrat. Derartige Biofilme sind z. B. in Belebtschlammflocken, in Bioreaktoren und im Boden bzw. Sediment vorhanden und werden seit geraumer Zeit großtechnisch zur Wasseraufbereitung genutzt (Santegoeds et al., 1998).

### 1.8.1 Nitrifikation / Denitrifikation in der Belebtschlammflocke

Um die Gewässer vor einer Eutrophierung zu schützen, gibt es Grenzwerte für Stickstoffverbindungen im Abwasser. Diese betragen laut Abwasserverordnung aktuell für eine Kläranlage der Größenklasse 4 ( $> 600 - 6.000 \text{ kg BSB}_5/\text{d}$ ) beim Ammonium-Stickstoff  $10,0 \text{ mg/L NH}_4^+\text{-N}$  und beim Gesamt-Stickstoff (Summe von Nitrat-, Nitrit- und Ammonium-Stickstoff)  $18,0 \text{ mg/L N}_{\text{ges}}$  (AbwV, 2004). Da diese Werte im unbehandelten Abwasser meist überschritten werden, ist eine Stickstoffentfernung vielerorts Stand der Technik (Gerardi, 2002; Stier et al., 2003).

Die Stickstoffentfernung wird in kommunalen Kläranlagen meist in Form von Nitrifikation und Denitrifikation mit Belebtschlamm realisiert. Dabei wird derselbe Belebtschlamm intermittierend belüftet, um so abwechselnd nitrifizieren und denitrifizieren zu können (Mudrack und Kunst, 2003). Während der Nitrifikation wird mit Hilfe von Sauerstoffeintrag durch Belüftung das vorliegende Ammonium vom Belebtschlamm aerob über Nitrit zu Nitrat oxidiert (Gleichung 16 – 18).



An der Nitrifikation sind immer zwei Bakteriengruppen beteiligt, und zwar zuerst die Ammoniumoxidierer, wie z. B. *Nitrosomonas* in Gleichung 16 und anschließend die Nitritoxidierer, wie z. B. *Nitrobacter* in Gleichung 17.

Im Anschluss an die Nitrifikation wird die Belüftung ausgeschaltet und das Nitrat wird unter anoxischen Bedingungen nach Gleichung 10 zu gasförmigem Stickstoff reduziert, der in die Atmosphäre entweichen kann. Im Laufe der technischen Entwicklung sind ganz unterschiedliche Prozesse zur Nitrifikation und Denitrifikation



eingesetzt worden. Eine Übersicht dieser Prozesse ist in Abbildung 1.16 gegeben (ATV-DVWK-A 131, 2000; Stier et al., 2003).

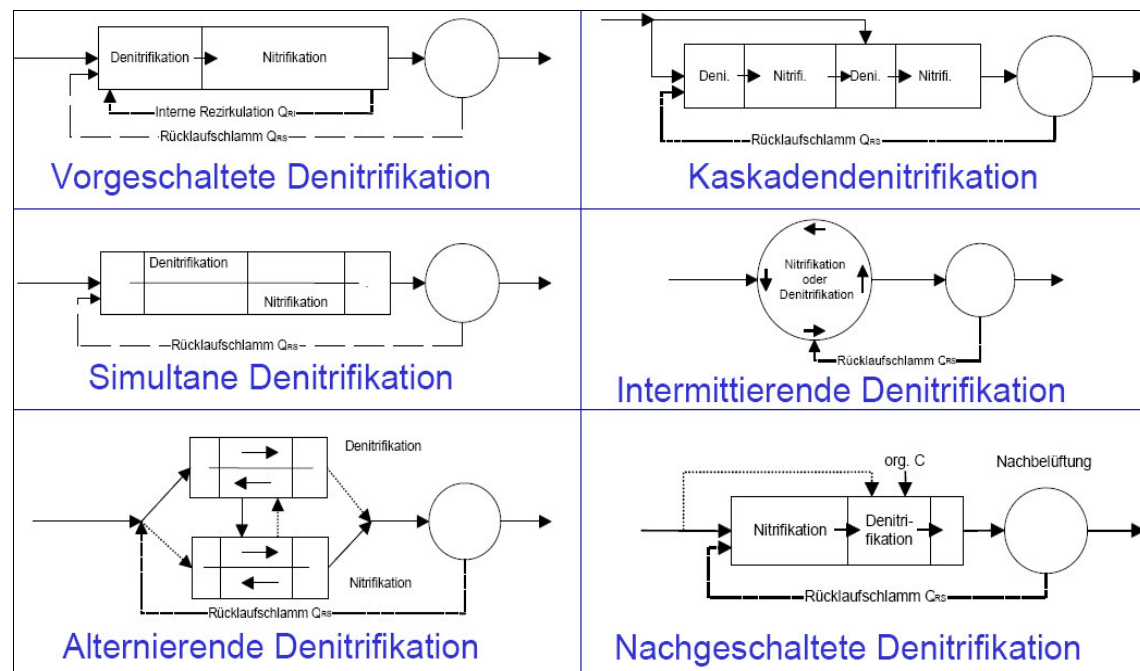


Abbildung 1.16: Verschiedene Denitrifikations-Konzepte (ATV-DVWK-A 131, 2000).

Wie in Abbildung 1.16 erkennbar, ist in einigen Fällen die Zugabe von externen Kohlenstoffquellen zur nachgeschalteten Denitrifikation notwendig. Aufgrund der vorgeschalteten Nitrifikation und dem parallel stattfindenden Abbau der organischen Inhaltsstoffe, kann es zu einem Nährstoffmangel im Bereich der späteren Denitrifikation kommen. Eine gute Nährstoffsituation ist für Kläranlagen gegeben, wenn die Nährstoffe im Verhältnis von C : N : P mit 100 : 5 : 1 im Rohabwasser vorliegen. Dabei steht C für Kohlenstoffverbindungen in mg BSB<sub>5</sub>, N steht für Stickstoffverbindungen in mg N und P steht für Phosphatverbindungen in mg P (Purtschert et al., 1996; Mudrack und Kunst, 2003). Betrachtet man die Denitrifikation separat, sollte das Nährstoffverhältnis von Stickstoff zu Kohlenstoff:  $N / C < 0,15$  betragen ( $C = \text{BSB}_5$  und  $N = \text{NO}_3\text{-N}$ ) (ATV-Arbeitsblatt 131, 2000).

### **1.8.2 Denitrifikation im industriellen Wasserkreislaufsystem**

Ein industrielles Wassersystem bietet zahlreiche Oberflächen, die potentiell von Biofilmen besiedelt werden können. Dabei kann es sich um Rohrleitungen, Behälter oder Maschinen / Aggregate handeln, die von Wasser durchflossen oder benetzt sind. Deshalb sind Biofilme im Bezug auf Biokorrosion und Biofouling bereits seit geraumer Zeit Gegenstand der Untersuchung (Flemming, 1996; Heitz et al., 1996). In der Praxis versucht man, diese negativen Effekte der Mikroorganismen durch den Einsatz von Bioziden oder Biodispersanten zu unterdrücken (Schrijver und Wirth, 2006). Von einem nützlichen Effekt der direkt im industriellen Wasserkreislaufsystem vorhandenen Mikroorganismen ist dagegen kaum die Rede.

Bei der Durchführung von Praxisversuchen mit Aluminiumnitratsulfatlösungen in der Papierindustrie und auch anderen Industriebetrieben mit relativ eng geschlossenem Wasserkreislauf wurde erwartungsgemäß zu Beginn der Versuche stets ein Anstieg für die Nitratkonzentration im Wasserkreislauf festgestellt. Die erhöhten Nitratkonzentrationen variierten für den jeweiligen industriellen Wasserkreislauf, als Maxima wurden Werte zwischen 150 und 700 mg/L bestimmt. Doch schon nach wenigen Tagen, in einem Fall bereits nach wenigen Stunden, konnten diese hohen Nitrat-Werte nicht mehr nachgewiesen werden. Stattdessen wurden Nitratkonzentrationen im Bereich zwischen 5 und 50 mg/L gemessen (diese Arbeit).

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre die biologische Nitratreduktion im Wasserkreislaufsystem der Industriebetriebe. Dabei könnten sowohl Biofilme auf den Werkstoffoberflächen der Rohrleitungen und Behälter beteiligt sein als auch Biofilme, die sich in Flocken bzw. suspendierten Agglomeraten im Wasserkreislauf befinden sowie einzeln suspendierte Bakterienzellen. Die Beteiligung von Mikroorganismen, planktonisch oder im Biofilm, wurde jedoch in keinem der Praxisversuche bisher nachgewiesen oder aufgeklärt (Capdepon et al., 2002; Faber und Vollmuth, 2007)

In wie weit deshalb mikrobielle Umsetzungen von Nitrat in den oben beschriebenen industriellen Wassersystemen stattfinden und ob Parameter wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Leitfähigkeit, Nitratgehalt oder Nitratquelle diesen Prozess beeinflussen, wurde bislang noch nicht untersucht. Auch hat es noch keinen systematischen Nachweis der Denitrifikation oder der beteiligten Bakteriengattungen direkt im Wasserkreislaufsystem von Industriebetrieben gegeben. Lediglich die Denitrifikation in nachgeschalteten Kläranlagen von industriellen Wassersystemen wurde bereits untersucht, dies geschah jedoch immer vor dem Hintergrund der Stickstoff-Entfernung um die Gewässerbelastung zu verringern und bezog sich meist

auf Kläranlagen, die nach dem Belebtschlamm-Verfahren arbeiten (Mudrack und Kunst, 2003; Stier et al., 2003).

Würde es gelingen, die Abnahme der Nitratkonzentration in industriellen Wasserkreisläufen mit der Aktivität von nitratreduzierenden Bakterien in Zusammenhang zu bringen, so könnte dies ein möglicher Weg sein, der Aufsalzung in Wasserkreislaufsystemen entgegenzuwirken. Wäre man in der Lage den Prozess der Kreislaufwasserentlastung durch biologischen Nitratabbau ohne Nachteile für den Produktionsprozess oder das fertige Endprodukt zu steuern, so könnte man industrielle Wasserkreisläufe weiter schließen und den Einsatz von Additiven effizienter und umweltschonender gestalten.

## **2 Ziele und wissenschaftliche Fragestellung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung ursächlicher Zusammenhänge zwischen der Aktivität von Mikroorganismen und dem Umsatz von Nitrat in industriellen Wasserkreisläufen unter praxisrelevanten Bedingungen sowie in Laborsystemen.

Dazu sollten die folgenden wissenschaftlichen Fragestellungen bearbeitet werden:

- 1) Findet eine Nitratreduktion durch die im Wasserkreislauf von Papierfabriken vorhanden Mikroorganismen statt?
- 2) Wo findet in industriellen Wasserkreisläufen der mikrobielle Nitratabbau statt: Im Biofilm auf festen Oberflächen, in Suspension und / oder in Flocken?
- 3) Welche Gruppen von Mikroorganismen und wie viele Mikroorganismen sind an den Umsetzungen beteiligt?
- 4) Wie beeinflussen Temperatur, Leitfähigkeit, pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Salzgehalt, Kohlenstoffquelle, Nitratmenge und Nitratquelle den mikrobiellen Nitratabbau in Wasserkreislaufsystemen?

Die Klärung dieser Fragen erfolgte zum einen anhand von Reaktorversuchen im Labor und zum anderen anhand von Praxisversuchen in ausgewählten Industriebetrieben.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Nährmedien

##### R2A-Agar

Firma Difco

Zusammensetzung laut Herstellerangaben:

Hefe Extrakt	0,5 g
Proteose Pepton Nr. 3	0,5 g
Casaminosäuren	0,5 g
Dextrose	0,5 g
Lösliche Stärke	0,5 g
Natriumpyruvat	0,3 g
Zweibasisches Kaliumphosphat	0,3 g
Magnesiumsulfat	0,05 g
Agar	15,0 g

Es wurden gemäß den Herstellerangaben 18,2 g Pulver eingewogen und mit einem Liter deionisiertem Wasser aufgefüllt. Bis zum Erhalt einer klaren Lösung wurde aufgekocht und anschließend für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Der pH-Wert lag nach dem Autoklavieren bei  $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$ .

##### CASO-Agar

Firma Merck

Zusammensetzung laut Herstellerangaben:

Pepton aus Casein	17,0 g
Pepton aus Sojamehl	3,0 g
D-(+)-Glucose	2,5 g
Natriumchlorid	5,0 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2,5 g

Es wurden gemäß den Herstellerangaben 40,0 g Pulver eingewogen und mit einem Liter deionisiertem Wasser aufgefüllt. Bis zum Erhalt einer klaren Lösung wurde aufgekocht und anschließend für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Der pH-Wert lag nach dem Autoklavieren bei  $\text{pH } 7,3 \pm 0,2$ .

### Nitratbouillon

Firma Difco

Zusammensetzung laut Herstellerangaben:

Rinderextrakt	3,00 g
Pepton	4,00 g
Proteose-Pepton Nr. 3	1,00 g
Kaliumnitrat	1,00 g

Es wurden gemäß den Herstellerangaben 9,0 g Pulver eingewogen und mit einem Liter deionisiertem Wasser aufgefüllt. Der pH-Wert lag nach dem Autoklavieren (20 min bei 121 °C) bei  $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$ .

### BUG-Agar<sup>TM</sup>

Biolog Universal Growth – Agar

Firma Biolog

Keine Angaben des Herstellers (Fa. Biolog) zur Zusammensetzung des Mediums.

Einwaage, gemäß den Herstellerangaben, von 57 g Pulver auf 1 L deionisiertem Wasser. Der pH-Wert wurde auf  $7,3 \pm 0,1$  eingestellt. Das Medium wurde anschließend für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

### 3.2 Allgemeine Laborgeräte

Reihenrührgerät Typ Flocculateur 11198	Fa. Fisher Bioblock Scientific
Mikroskop Typ Laborlux S	Fa. Leitz
Photometer Typ SQ 118	Fa. Merck
Magnetrühr-/Heizplatte Typ RCT basic	Fa. IKA Labortechnik
Temperaturfühler Typ ETS D4 fuzzy	Fa. IKA Labortechnik
Vortex Typ Genie 2	Fa. Scientific Industries
Ultra-Turrax Typ T2S Basic	Fa. IKA Labortechnik
Stomacher Typ 400 Circulator	Fa. seward
Heizblock für Spectroquant Küvettentests	Fa. Merck
Titration Typ SP 100	Fa. Skalar
Analysator Typ TOC 1200	Fa. Euroglas
Photometer Typ Nephla	Fa. Dr. Lange
Ionenchromatograph Typ ED 40	Fa. Dionex
Leitfähigkeitsmessgerät Typ LF 325	Fa. WTW
Messgerät pH-Wert Typ pH 320	Fa. WTW
Sauerstoffmessgerät Typ Qoxi 90	Fa. Merck Eurolab GmbH
Multimeter Typ Multi 340i	Fa. WTW
Standmixer	

Weitere laborübliche Kleingeräte sind hier nicht aufgeführt.

### 3.3 Vergleich der Koagulationseigenschaften

Mit Hilfe des so genannten Jar-Tests wurden die Koagulationseigenschaften der verschiedenen Aluminiumsalzlösungen getestet (Bratby, 2006). Die Belastung des Wassers mit Kolloiden wurde durch eine Aktivkohle-Suspension (10,0 % (w/w)), gepulvert und reinst (Fa. Merck) in Trinkwasser aus Duisburg-Homburg simuliert. Da die Effizienz der Koagulation stark von der Rührgeschwindigkeit und Rührzeit abhängt, wurde zur Vereinheitlichung der Rahmenbedingungen ein Reihenrührwerk mit sechs Stellplätzen verwendet, welches die gleichen Rahmenbedingungen für alle Proben sicherstellt (Abbildung 3.1).



Abbildung 3.1 Reihenrührwerk / Jar Tester mit sechs Stellplätzen vom Typ Flocculateur 11198, (Fa. Fisher Bioblock Scientific).

Für die Versuche wurden 1 Liter Bechergläser (hohe Form) verwendet, die mit 800 mL Trinkwasser gefüllt wurden. Es wurde 1,0 mL der Aktivkohlesuspension in das Trinkwasser eingerührt und gleichmäßig vermischt. Der pH-Wert und die Temperatur wurden vor und nach Beendigung des Versuches gemessen. Zur genauen Dosierung wurden die zu prüfenden Flockungsmittel als Lösung (10,0 % (w/w)) frisch angesetzt.

Die Zugabe der Metallsalzlösungen (Koagulanten) erfolgte gleichzeitig, um für alle Bechergläser die Reaktionszeit konstant zu halten. Für eine gute Einmischung der Koagulanten wurde zunächst für 1 min mit 200 U/min gerührt. Nach 5 min Rühren bei 30 U/min zur weiteren Ausbildung der Flocken, wurde das Rührwerk gestoppt. Danach ließ man die gebildeten Flocken für weitere 25 min sedimentieren. Bereits während der Einmisch- und Nachrührphase wurde die Flockenausbildung sowie die Entwicklung der Flockengröße für die jeweiligen Koagulanten über die Zeit visuell beobachtet und relativ zueinander beschrieben. Das Sedimentationsverhalten der Flocken nach Stoppen der Rührung wurde ebenfalls qualitativ beschrieben.

Der klare Überstand, der sich nach der Sedimentierphase gebildet hat, wurde dekantiert und 20 mL davon in die Mess-Küvette des Trübungsphotometers Typ Nephla (Fa. Dr. Lange) gegeben. Bei einer Wellenlänge von 860 nm wurde mit Hilfe der 90° Streulichtphotometrie die Trübung der Wasserprobe automatisch vom Gerät ermittelt und im Display in Trübungseinheiten Formazin (TE / F) angezeigt. Je mehr Aktivkohle-Teilchen durch Koagulation aus dem Wasser geflockt werden und sedimentieren, desto niedriger ist im Anschluss der Trübungswert im Überstand.



### 3.4 Chemische Analytik

#### 3.4.1 Bestimmung des Trockenrückstandes

Die Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehaltes von Biofilmpuben wurde nach DIN EN 12880: „Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehaltes“ durchgeführt (DIN EN 12880, 2001). Dazu wurde ein Porzellantiegel bis zur Gewichtskonstanz gegläht, im Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt und auf 1 mg genau ausgewogen ( $m_a$ ). Anschließend wurde die Biofilm-Feuchtmasse in den Tiegel eingewogen ( $m_b$ ) und im Wärmeschrank bei 105 °C ( $\pm 2$  °C) getrocknet, bis der Rückstand trocken erschien. Nach Erkalten im Exsikkator wurde der Tiegel mit dem Rückstand gewogen ( $m_c$ ). Die Trockenmasse ( $m_c - m_a$ ) wurde als konstant angesehen, wenn ihr Gewicht nach einer weiteren Trocknung (30 Minuten), von dem zuvor bestimmten Gewicht, um nicht mehr als 2 mg abwich. Andernfalls wurde die Trocknung wiederholt, bis Massenkonzanz erreicht wurde. Der Trockenrückstand wird in Massenprozent oder in g/kg angegeben und ergibt sich als:

$$w_{dr} = ( (m_c - m_a) / (m_b - m_a) ) \times f \quad (19)$$

dabei ist:

- $w_{dr}$  der Trockenrückstand der Probe, in Prozent oder in g/kg
- $m_a$  die Masse des leeren Tiegels in g
- $m_b$  die Masse des Tiegels mit Probe in g
- $m_c$  die Masse des Tiegels mit der Trockenmasse der Probe in g
- $f$  der Umrechnungsfaktor,  $f = 100$  für die Angabe der Ergebnisse in % und  $f = 1.000$  für die Angabe in g/kg.

#### 3.4.2 Bestimmung des Glühverlustes der Trockenmasse

Diese Analyse wurde nach DIN EN 12879: „Bestimmung des Glühverlustes der Trockenmasse“ durchgeführt (DIN EN 12879, 2001). Dazu wurden dieselben Biofilmpuben aus der Bestimmung des Wassergehaltes auch für die Bestimmung des Glühverlustes verwendet. Es wurde der im Trockenschrank getrocknete und auf 1 mg genau ausgewogene Tiegel, für 18 Stunden über Nacht bei 550 °C im Muffelofen gegläht und anschließend auf der Analysenwaage erneut gewogen ( $m_d$ ). Die Masse des geglähten Rückstandes wurde als konstant angesehen, wenn die nach weiterem halbstündigem Glühen bei 550 °C erhaltene Masse ( $m_d - m_a$ ), von der vorherigen Bestimmung um nicht mehr als 2 mg abwich. Andernfalls wurde der Glühvorgang wiederholt, bis man Massenkonzanz erhielt.

Der Glühverlust der Trockenmasse einer Probe ist als Massenanteil in Prozent nach der Gleichung (9) zu errechnen.

$$w_V = ( (m_c - m_d) / (m_c - m_a) ) \times 100 \quad (20)$$

dabei ist:

- $w_V$  der Glühverlust der Trockenmasse einer Probe, in Prozent
- $m_a$  die Masse des leeren Tiegels in g
- $m_c$  die Masse des Tiegels mit der Trockenmasse der Probe in g
- $m_d$  die Masse des Tiegels mit der geglühten Trockenmasse der Probe in g.

### **3.4.3 Bestimmung von Nitrat**

#### **3.4.3.1 Wasserproben**

Der Nitratgehalt von Wasserproben wurde mit Hilfe von kommerziellen Küvettentests bestimmt. Für die Nitratmessung kamen dabei zwei Testkits mit unterschiedlichen Messbereichen zum Einsatz.

##### Spectroquant-Küvettentests (Fa. Merck)

Nitrat (Messbereich: 102 – 996 mg/L  $\text{NO}_3^-$ )

Nitrat (Messbereich: 2,2 – 110,7 mg/L  $\text{NO}_3^-$ )

Beide Testkits entsprechen der DIN 38405 Teil 29: Photometrische Bestimmung von Nitrat mit Sulfosalizylsäure (DIN 38405 Teil 29, 1994). Hierbei bilden Nitrat-Ionen in schwefel- und phosphorsaurer Lösung mit 2,6-Dimethyl-phenol (DMP) orangefarbenes 4-Nitro-2,6-dimethylphenol, das photometrisch bestimmt wird.

Bei der Analyse wurde 1 mL der zu untersuchenden Wasserprobe in die Reaktionsküvette pipettiert, die bereits Schwefel- und Phosphorsäure enthielt. Direkt danach erfolgte ohne vorheriges Mischen die Zugabe von 1,0 mL Reagenz  $\text{NO}_3^-$ -1K (DMP in 2-Propanol). Die Küvette wurde fest verschlossen und anschließend geschüttelt. Nach 10 Minuten wurde die heiß gewordene Küvette dann im Photometer SQ 118 (Fa. Merck) bei einer Wellenlänge von 324 nm ausgewertet.

#### **3.4.3.2 Papierproben**

Für die Bestimmung des Nitratgehaltes in Papierproben wurden fertig konfektionierte Papier-Produkte aus der Papierfabrik entnommen. Im ersten Arbeitsschritt wurden die DIN A 4 Papierbögen mit einem Aktenzerkleinerer zerschnitten. Von diesen

Papierstückchen wurden dann 5 g abgewogen und mit 30 mL deionisiertem Wasser für 10 min bei 70°C aufquellen gelassen. Diese Suspension wurde mit weiteren 200 mL deionisiertem Wasser für die weitere Aufbereitung ergänzt. Die gesamte Suspension wurde dann in einen Standmixer überführt. Hier erfolgte die Zerfaserung bzw. das Auflösen der Papierprobe in einzelne Zellstofffasern innerhalb von fünf Minuten. Das so dispergierte Papierstoff- / Wassergemisch wurde anschließend aus dem Mixer in ein Becherglas überführt und für eine Stunde sedimentiert. Der wässrige Überstand wurde dekantiert und 50 mL des Überstandes zur weiteren Feinstoffabtrennung zentrifugiert. Die so erhaltene klare, feststofffreie Wasserprobe wurde mittels Ionenchromatographie in Hinblick auf den Nitratgehalt analysiert. Dabei wurden 50 µL Injektionsvolumen in einem Ionenchromatographen (Fa. Dionex) mit einem Detektor vom Typ ED 40 analysiert. Die verwendete Säule war vom Typ AS4a SC und der Eluent enthielt 1,8 mmol Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 1,7 mmol NaHCO<sub>3</sub> in Wasser. Die Flussrate lag bei 1 mL/min und die Pumpe war vom Typ GP 50.

Nach Bestimmung der Nitratkonzentration in der wässrigen Probe, wurde dann der Nitratgehalt im Bezug auf die ursprünglich eingewogene Trockenmasse zurückgerechnet. Man erhält als Ergebnis die Angabe mg Nitrat / g otro Papier.

#### **3.4.4 Bestimmung von Nitrit**

Der Nitritgehalt wurde mit Hilfe von Küvettentests der Firma Merck (Messbereich: 0,03 – 2,3 mg/L NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) bestimmt. Nitrit-Ionen bilden in saurer Lösung mit Sulfanilsäure ein Diazoniumsalz, das mit N-(1-Naphtyl)-ethylendiamindihydrochlorid zu einem rotvioletten Azofarbstoff reagiert. Dieser wird photometrisch bestimmt. Das Verfahren ist analog DIN EN 26777 D10, Wasserbeschaffenheit; Bestimmung von Nitrit; Spektrometrisches Verfahren (DIN EN 26777, 1993).

### 3.4.5 Chemischer Sauerstoffbedarf

Der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden ermittelt. Zum einen wurde er mit Hilfe von Küvettentests (Fa. Merck; Messbereich: 500 – 10.000 mg/L O<sub>2</sub>) bestimmt und zum anderen mit Hilfe eines Titrators Typ SP 100 (Fa. Skalar). Die Wasserproben wurden bei beiden Methoden auf die gleiche Weise mit Chemikalien behandelt. Dabei wurde zunächst mit heißer schwefelsaurer Kaliumdichromat-Lösung und Silbersulfat als Katalysator oxidiert. Chlorid wurde mit Quecksilbersulfat maskiert. Anschließend wurde beim Küvettentest die Konzentration der grünen Cr<sup>3+</sup>-Ionen photometrisch bestimmt. Dieses Verfahren ist analog DIN ISO 15705, Wasserbeschaffenheit – Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (ST-CSB) – Küvettentest (DIN ISO 15705, 2003).

Bei den Analysen des Inokulum aus der Papierfabrik 1 wurde aufgrund des hohen Faseranteils der Probe nicht mit Küvettentests, sondern nach der Methode DIN 38409 H41 gearbeitet und ein Analysegerät des Typs Titrator SP 100 mit Aufschlussblock Digester verwendet (DIN 38409 H41, 1980). Die chemische Probenaufbereitung war wie oben beschrieben. Das überschüssige Kaliumdichromat wurde mit Eisen-Ammoniumsulfatlösung potentiometrisch zurück titriert und vom Gerät in mg/L Sauerstoff angegeben.

Bei den CSB-Analysen vor Ort in der Papierfabrik 1 wurde sichergestellt, dass der abfiltrierbare Anteil des CSB-Wertes vernachlässigbar ist. Deshalb wurde die CSB-Bestimmung nach Filtration durch eine 0,45 µm Membran durchgeführt und mit dem Ergebnis der unfiltrierten Probe verglichen. Partikuläre Stoffe wie Faserbruchstücke, Mikroorganismen oder andere oxidierbare Substanzen die durch den 0,45 µm Filter zurückgehalten wurden, waren in der unfiltrierten Probe mit einem prozentualen Anteil von ca. 3,5 % des unfiltrierten CSB-Wertes enthalten. Aus diesem Grund wurden die weiteren CSB-Analysen ebenfalls unfiltriert durchgeführt.

### 3.4.6 Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) und gesamter organischer Kohlenstoff (TOC)

Die beiden Parameter DOC und TOC wurden anhand der DIN EN 1484 bestimmt (DIN EN 1484, 1997). Dabei kam der Analysator Typ TOC 1200 der Firma Euroglas zum Einsatz. Das Messprinzip war bei beiden Parametern gleich. Zunächst wurde der anorganische Kohlenstoff durch Ansäuern mit Phosphorsäure als Kohlendioxid gasförmig ausgetrieben. Danach wurden jeweils 100 µL der Probe bei 1000 °C mit Hilfe eines Platin-Katalysators verbrannt. Das entstandene CO<sub>2</sub> wurde IR-spektrometrisch bestimmt und entspricht dem TOC.

Zur Bestimmung des DOC wurde die vorbehandelte Probe durch eine 0,45 µm Cellulose-Acetat-Membran filtriert und 100 µL des Filtrats wie zuvor beschrieben katalytisch verbrannt und das entstandene Kohlendioxid quantifiziert.

### **3.5 Mikrobiologische Analytik**

#### **3.5.1 Koloniezahl-Bestimmung (KBE) mit R2A- und CASO-Agar**

Für die Koloniezahl-Bestimmung wurden zwei verschiedene Medien verwendet, zum einen der nährstoffarme R2A-Agar und zum anderen der nährstoffreiche Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CASO-Agar). Die zu analysierenden Proben wurden unverdünnt und dezimal in partikelfreiem deionisiertem Wasser verdünnt untersucht. Von jeder Verdünnungsstufe wurden auf drei Agar-Platten je 100 µL Probenvolumen mit einem Drigalskispatel auf der gesamten Agar-Fläche ausgespatelt (Reasoner und Geldreich, 1984). Die Inkubation der Platten erfolgte im Brutschrank bei 40°C für 7 Tage. Teilweise wurde auch zusätzlich nach 14 Tagen ausgewertet. Eine Auszählung der Agar-Platten erfolgte im Bereich von 30 bis 300 Kolonien. Als Ergebnis wurden koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Volumen (mL) oder Fläche (cm<sup>2</sup>) angegeben.

#### **3.5.2 Gesamtzellzahlbestimmung mit der DAPI-Methode**

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde mikroskopisch nach Anfärbung der Bakterienzellen mit DAPI vorgenommen (Hobbie et al., 1977; Saby et al., 1997; van Ommen Kloeke und Geesey, 1999). Dabei wurden auf 5 mL Probenvolumen 1 mL der DAPI-Färbelösung gegeben und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die DAPI-Färbelösung bestand aus 10 µg/L DAPI in einer Formaldehydlösung, 2 %, w/v. Danach wurde die gesamte Flüssigkeitsmenge über einen schwarzen Polycarbonatfilter (Typ Isopore 0,2 µm GTBP, Fa. Millipore) mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm abfiltriert. Der Polycarbonatfilter wurde in eine Petrischale gegeben und luftgetrocknet. Später wurde er dann für die Auswertung mit einem Öltropfen Immersionsöl auf einem Objektträger fixiert. Die Auszählung der Bakterienzellen erfolgte unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung und wurde in Zellen/mL bzw. Zellen/cm<sup>2</sup> angegeben.

### 3.5.3 Nachweis von nitratreduzierenden Bakterien

Es wurde das MPN-Verfahren (most probable number) mit einem dreifachen Ansatz pro Verdünnungsstufe angewandt. Der Nachweis der nitratreduzierenden Bakterien erfolgte über eine Flüssigkeitsanreicherung mit Nitratbouillon, wobei das Nährmedium wie oben in Abschnitt 3.1 beschrieben, angesetzt wurde. Im Schraubdeckelröhrchen wurden jeweils 1,0 mL der Verdünnungsstufe vorgelegt, dann mit Nährmedium bis zum Rand aufgefüllt und das Röhrchen zugeschraubt. Danach wurden die Ansätze im Brutschrank für 7 Tage bei 40 °C inkubiert.

Für die Auswertung erfolgte als erstes die Zugabe von jeweils einem Tropfen der beiden Reagenzien Nit 1 und Nit 2 zum beimpften Ansatz.

#### Reagenzien Nit 1 und Nit 2, (Fa. bioMérieux)

Zusammensetzung:

Nit 1: Sulfanilsäure	0,4 g
Essigsäure	30,0 g
H <sub>2</sub> O	70,0 mL
Nit 2: N,N-Dimethyl-1-naphtylamin	0,6 g
Essigsäure	30,0 g
H <sub>2</sub> O	70,0 mL

Nitrit wird bei der Untersuchung mit Hilfe eines rosa-roten Farbkomplexes nachgewiesen. Bei einem Farbumschlag von farblos nach rosa oder rot wurde der Ansatz als positiv bewertet, da Reduktion von Nitrat zu Nitrit stattgefunden hat. Falls kein Farbumschlag beobachtet wurde, musste eine kleine Spatelspitze Zink-Pulver hinzugegeben werden. Durch das Zink-Pulver sollte eventuell noch vorhandenes Nitrat zu Nitrit reduziert werden. Blieb der Ansatz farblos, bedeutete dies ein positives Ergebnis, da kein Nitrat mehr im Ansatz nachweisbar war und das gesamte Nitrat reduziert worden war.

Blieb der Ansatz nach Zugabe von Nit1 und Nit2 farblos und färbte sich erst nach Zugabe von Zinkpulver rosa bzw. rot, wurde der Ansatz als negativ bewertet, da das gesamte Nitrat noch im Röhrchen vorhanden und kein Nitrit nachweisbar gewesen war. Die so bestimmten positiven und negativen Ergebnisse wurden in eine Tabelle eingetragen und daraus wurde ein dreistelliger Zahlenschlüssel bestimmt, wie in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Beispielhafte Ergebnis-Tabelle für die Auswertung einer MPN-Reihe. „+“ bedeutet ein positiv getestetes Röhrchen. „-“ bedeutet ein negativ getestetes Röhrchen.

Verdünnungsstufe der Probe	Ergebnis Ansatz 1	Ergebnis Ansatz 2	Ergebnis Ansatz 3	Summe positiver Röhrchen
$10^0$	+	+	+	3
$10^{-1}$	+	+	+	3
$10^{-2}$	+	+	+	3
$10^{-3}$	+	+	+	<u>3</u>
$10^{-4}$	+	-	+	<u>2</u>
$10^{-5}$	-	-	+	<u>1</u>
$10^{-6}$	-	-	-	0
$10^{-7}$	-	-	-	0
$10^{-8}$	-	-	-	0

Als erste Zahl des Zahlenschlüssels wurde stets die höchstkonzentrierte noch komplett positive Verdünnungsstufe verwendet. Danach folgte als zweite und dritte Zahl des Zahlenschlüssels die Anzahl der positiven Röhrchen in den beiden darauf folgenden Verdünnungsstufen. So entsteht zum Beispiel aus der hier dargestellten Beispiel-Tabelle 3.1 der Zahlenschlüssel „3 2 1“. Der auf diese Weise bestimmte Zahlenschlüssel wurde anschließend mit Hilfe der so genannten McCrady-Tabelle ausgewertet. In dieser Tabelle entspricht jeder Zahlenschlüssel einer bestimmten höchstwahrscheinlichen Zellzahl (MPN). Die Angabe erfolgte stets in MPN/mL (McCrady, 1915).

### 3.5.4 Identifizierung von Bakterien

Zur Identifizierung von Bakterien wurden in ausgewählten Reaktorläufen exemplarisch Untersuchungen durchgeführt. Jeweils ein MPN-Röhrchen wurde aus der MPN-Verdünnungsreihe für nitratreduzierende Bakterien ausgewählt, ein Aliquot entnommen und Einzelkolonieausstriche auf Nitrat-Agar angelegt. Die Bebrütung erfolgte bei 36°C für 24 Stunden. Die Subkulturen wurden visuell begutachtet. Alle unterschiedlichen Kolonientypen wurden anschließend auf Nitrat-Agar überimpft, um Reinkulturen zu gewinnen.

Zur Charakterisierung von Reinkulturen wurde zunächst eine Gram-Färbung mit dem Gram-Färb-Kit Color Gram 2 (Fa. bioMérieux) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Betrachtung der Bakterien erfolgte unter dem Mikroskop bei 1000facher Vergrößerung im Hellfeld unter Benutzung von Immersionsöl.

Anschließend wurde die Cytochromoxidase-Reaktion der Isolate mit Bactident-Oxidase-Teststäbchen (Fa. Merck) bestimmt. Basierend auf diesen Voruntersuchungen wurden zur Identifizierung die Gram-negativen Isolate mit dem API 20 E- bzw. API 20 NE-System nach Angaben des Herstellers (Fa. bioMérieux) untersucht. Gram-positive stäbchenförmige Bakterien wurden mit dem API 50 CH-System unter Verwendung des API 50 CHE/B-Mediums nach Angaben des Herstellers (Fa. bioMérieux) untersucht. Die Auswertung zur Identifizierung der Isolate erfolgte mit Hilfe der Software APILAB PLUS mit der Datenbank Api 20 NE V6.0 (Fa. bioMérieux). Isolate, die mit den API-Systemen nicht eindeutig zu identifizieren waren, wurden mit dem Biolog-System unter Verwendung von GN2-Mikrotiterplatten (Trübungsstandard GN-ENT 52%) und der Software Microlog1 Release 4.20 (Fa. AES Chemunex GmbH) weiter untersucht.

#### **3.5.4.1 API-System**

Zur Identifizierung der beteiligten Mikroorganismen wurden die in dieser Arbeit isolierten Bakterienstämme mit dem von der Firma bioMérieux kommerziell erhältlichen Testsystem API 20 E bzw. API 20 NE identifiziert. Ausgehend von Einzelkolonieausstrichen auf Nitrat-Agar, wurden die Teststreifen entsprechend den Herstellerangaben beimpft und 24 Stunden bei 36 °C (API 20 E) bzw. 24 Stunden bis 48 Stunden bei 30 °C (API 20 NE) bebrütet. Die Auswertung erfolgte nach Herstellerangaben mittels einer Ablesetabelle. Die Identifikation der untersuchten Isolate erfolgte durch Auswertung der ermittelten Reaktionsprofile mit Hilfe der Software apiLAB Plus (Datenbank-Versionen: V 4.0 API 20 E bzw. V 6.0 API 20 NE).

#### **3.5.4.2 Biolog-System**

Zur Identifizierung wurden die in dieser Arbeit isolierten Bakterienstämme mit dem kommerziellen Testsystem Biolog (Fa. Biolog) identifiziert. Hierbei wurde entsprechend der Angaben des Herstellers verfahren. Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte auf BUG™-Agar für 24 Stunden bei 30 °C. Die Identifikation der eingesetzten Isolate erfolgte durch Auswertung der ermittelten Substratverwertungsreaktionen mit Hilfe der Software Biolog MicroLog1 (Version WE 4.2) und der Datenbank GP WE 6.11 für die Gram-positiven Isolate, sowie der Datenbank WE 6.01 für die Gram-negativen Isolate.



### 3.6 Bioreaktor-System zur Untersuchung des mikrobiellen Nitratabbaus

Für die Untersuchung der Parameter die den Nitratabbau beeinflussen, wurde ein Batch-Reaktor-System verwendet, welches sich bereits im Rahmen vorangegangener Forschungsprojekte gut bewährt hatte (Schulte, 2003). Der Aufbau ist in Abbildung 3.2 dargestellt.



Abbildung 3.2: Batch-Bioreaktor-System für Laborversuche.

In einem 1 Liter Becherglas wurde ein Teflon-Ring mit Vertiefungen zur Befestigung von Edelstahlcoupons auf den Becherglas-Boden gelegt. In den Ring konnten maximal sechs Edelstahlcoupons eingespannt werden. Die Stahlcoupons hatten eine Länge von 9,0 cm, eine Breite von 3,0 cm und besaßen eine Stärke von 0,1 cm. Der Stahltyp ist unter den folgenden Bezeichnungen bekannt: V4A, 1.4571 bzw. X6CrNiMoTi17-12-2. Vor Einbringen in den Reaktor wurden die Coupons mit Aceton entfettet. In die Mitte des Teflonrings wurde ein Magnetrührfisch gegeben. Das Becherglas wurde mit Aluminiumfolie verschlossen und bei 121 °C für 20 Minuten im Autoklaven sterilisiert. Anschließend wurde es bis auf ein Volumen von 900 mL mit Nährmedium befüllt und auf eine Heizrührplatte mit angeschlossenem Kontaktthermometer gestellt, um Temperierung und Durchmischung gewährleisten zu können.

Als Nährmedium für die Versuche zur mikrobiologischen Nitratentfernung wurde halbkonzentrierter Nitratbouillon (Fa. Difco) verwendet, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben. Die Flüssigkeitsmenge betrug in allen Versuchen 896 Milliliter. Bei allen Versuchen wurden als Inokula für die sterilen Batch-Reaktoren jeweils 4,0 g Dickstoff aus der Einlage mit einer Stoffdichte von 40 g/L aus derselben Papierfabrik verwendet.

### **3.6.1 Nachweis des mikrobiellen Nitratabbaus in der Papierfabrik 1**

Zum Nachweis der biologischen Nitratentfernung in der Papierfabrik 1 wurde direkt vor Ort in der Papierfabrik eine vereinfachte Version des Batch-Reaktors aus dem vorangegangenen Kapitel aufgebaut und der folgende Versuch durchgeführt. Drei 1 L Bechergläser wurden mit 900 mL Siebwasser aus dem Wasserkreislauf der Papierfabrik 1 befüllt und die Nitratkonzentration durch Zugabe von Natriumnitrat-Lösung (ca. 2,0 mL) auf 250 mg/L Nitrat eingestellt. Alle drei Becherglas-Reaktoren wurden auf Heizrührer gestellt und dort unter leichtem Rühren betrieben.

Der erste Reaktor wurde als Kontrollreaktor bis zum Sieden des Wassers erhitzt und auf Siedetemperatur belassen, um so alle enthaltenen Mikroorganismen abzutöten und auf diese Weise einen mikrobiologischen Nitratabbau zu unterbinden. Der zweite Reaktor wurde bei normaler Siebwassertemperatur von 35 °C – 40 °C betrieben, um den Einfluss der planktonischen Mikroorganismen und planktonischen Agglomerate auf die Nitratkonzentration zu untersuchen. Der dritte Reaktor wurde wie Reaktor 2 befüllt und ebenfalls bei einer Temperatur von 35 °C – 40 °C gehalten, doch zusätzlich wurde noch frisch entnommener Biofilm (13,4 g) aus dem Wasserkreislauf der Papierfabrik zugegeben. Die Entnahme des Biofilms für die Zugabe zum Becherglas-Reaktor erfolgte genau an der Stelle, an der die Biofilme aus der Papierfabrik 1 für die Biofilm-Analysen abgeschabt worden waren.

Um die Abnahme der Nitratkonzentration über die Zeit zu messen wurde bei  $t = 0$  h eine Probe aus allen drei Reaktoren entnommen und die Nitratkonzentration photometrisch gemessen. Dieses Prozedere wurde in Zeitintervallen von 45 min wiederholt. Neben der Nitratkonzentration wurden der pH-Wert, die Leitfähigkeit und die Temperatur in den Reaktoren mitbestimmt. Der Versuch wurde nach insgesamt 4 Stunden Versuchsdauer beendet.

### **3.7 Betriebsuntersuchungen**

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Betriebsuntersuchungen in verschiedenen industriellen Wasserkreisläufen durchgeführt. Auf insgesamt vier der untersuchten Betriebe soll nun im Einzelnen eingegangen werden. In diesem Kapitel erfolgt zunächst die Beschreibung der Wassersysteme der untersuchten Betriebe. Die Ergebnisse der chemischen und mikrobiologischen Analysen vor, während und nach der Dosierung von Aluminiumnitratsulfat (ANS) werden im folgenden Kapitel dargestellt.

#### **3.7.1 Papierfabrik 1**

Bei dem ersten untersuchten Betrieb handelt es sich um eine Papierfabrik zur Produktion von Graukarton. Das innerbetriebliche Wassersystem ist ein komplett geschlossener Kreislauf, da kein Wasser die Papierfabrik in Richtung Gewässer oder Kläranlage verlässt. Stattdessen verbleibt das Wasser im Kreislauf und wird ständig weiter verwendet. In dem hier beschriebenen Kreislauf treten lediglich Verdunstungsverluste bei der Trocknung des Kartons auf, die durch Ergänzung von Frischwasser ausgeglichen werden. Die Rohstoffbasis der Kartonfabrik besteht zu 100 % aus Altpapier.

Der spezifische Wasserbrauch einer Papierfabrik ist ein Maß für die Wiederverwendung von Wasser und liegt branchenspezifisch in einem Bereich zwischen  $< 1,0$  kg Wasser (komplett geschlossener Wasserkreislauf) bis zu 60 kg Wasser pro kg produziertem Papier (integrierte Papierfabrik mit eigener Zellstoffherzeugung). In der hier beschriebenen Kartonfabrik beträgt der spezifische Wasserbedarf ca. 0,5 kg Wasser pro kg Papier. Die Jahresproduktion des Betriebes liegt bei ca. 30.000 Tonnen Graukarton. Der gesamte Wasserkreislauf der Fabrik enthielt insgesamt ca. 450 m<sup>3</sup> Wasser. Eine aus zwei Stufen bestehende Druckentspannungsflotation ist dabei als Reinigungsstufe und zur Stoffrückgewinnung in den Wasserkreislauf integriert. Die Dosierung von Aluminiumsalzen wird in diesem Betrieb an der Druckentspannungsflotation zur Reinigung des Wasserkreislaufes von Feinstoffen und Störstoffen durchgeführt. Eine weitere Dosierung von Aluminiumsalzen findet zur Harzleimfixierung an der Papiermaschine statt.

Aufgrund der stark belasteten Rohstoffbasis Altpapier, sowie zahlreicher Additive, die für die Papierproduktion zugesetzt werden, sind in diesem Wasserkreislaufsystem mit nur 450 m<sup>3</sup> Gesamtwassermenge sehr hohe Stoff- und Ionenkonzentrationen möglich. So lag z. B. der gelöste CSB-Wert, als Maß für die im System vorhandenen

Kohlenstoffverbindungen, vor der Umstellung von Polyaluminiumchloridsulfat (PACS) auf ANS bei ca. 28.000 mg/L und die Leitfähigkeit im Wasserkreislauf bei ca. 18 mS/cm. Die Chloridkonzentration betrug im Wassersystem der Papierfabrik aufgrund der vorherigen Dosierung von Polyaluminiumchlorid ca. 1.500 mg/L. Als Biozid zur Schleimbekämpfung und Vermeidung von biogenen Gerüchen wurde eine Brom-/Chlorverbindung dem Wasserkreislauf zudosiert. Die Probennahme der Biofilmpuben erfolgte im Klarwasserüberlauf-Becken der zweiten Druckentspannungsflotation von einer Stahloberfläche des Typs 1.4571. Die Wasserproben wurden an der gleichen Stelle im Überlaufbecken aus dem fließenden Wasser entnommen.

### **3.7.2 Papierfabrik 2**

Die Papierfabrik 2 ist ein Betrieb zur Produktion von Liner-Papieren aus 100 % Altpapier als Rohstoff. Die hier produzierten Papiere sind feste Papiere bzw. Pappen, die ein Flächengewicht von über 130 g/m<sup>2</sup> besitzen und zweilagig gearbeitet sind. Die jährliche Produktionsmenge beträgt ca. 320.000 Tonnen Papier und das Volumen im Wasserkreislauf wird auf ca. 1000 m<sup>3</sup> geschätzt. Der spezifische Wasserverbrauch der Papierfabrik liegt bei 3,0 kg Wasser pro kg Papier und ist ein hoch geschlossener Wasserkreislauf, da nur geringfügige Mengen Wasser den Kreislauf verlassen. Zur Wasserreinigung und Stoffrückgewinnung sind ein Scheibenfilter sowie eine Druckentspannungsflotation in den Wasserkreislauf integriert.

Die Zugabe von Aluminiumsalzen wird im Dünnstoffbereich der Papiermaschine zur Stör-, Feinstoff- und Aschefixierung in zwei Lagen durchgeführt. Vor der Verwendung von ANS war an der Papiermaschine ein PACS im Einsatz gewesen. Eine Biozid-Dosierung zur Vermeidung von mikrobiologisch verursachten Problemen wird im Wassersystem der Papierfabrik durchgeführt.

Aufgrund des hoch geschlossenen Wasserkreislaufes kommt es auch in dieser Papierfabrik zu einer erkennbaren Anreicherung von Stoffen und Salzen. Der Chloridgehalt im Wasserkreislauf betrug vor der Umstellung auf ANS ca. 250 mg/L. Die Leitfähigkeit im System lag bei ca. 2,5 mS/cm und der CSB-Wert betrug ca. 6.000 – 8.000 mg/L. Der innerhalb von fünf Tagen biologisch abbaubare Anteil wird als BSB<sub>5</sub> ausgedrückt, er lag in der Papierfabrik 2 bei ca. 1.500 – 2.000 mg/L, also rund einem Viertel des chemischen Sauerstoffbedarfs. Die zu untersuchenden Biofilmpuben wurden aus der Siebwasserrinne von einer Stahloberfläche des Typs

1.4571 abgeschabt. Die Wasserproben wurden aus dem fließenden Wasser des Siebwassertisches entnommen.

### **3.7.3 Recyclingbetrieb**

Bei diesem Betrieb handelt es sich um ein Unternehmen zur Wiederverwertung von Reststoffen aus Privathaushalten. Pro Jahr werden hier „gelbe Säcke“ in einer Menge von ca. 25.000 t recycelt und die Inhaltsstoffe so sortiert bzw. aufgearbeitet, dass sie einer weiteren Verwertung zugeführt werden können.

Ein Bereich innerhalb dieses Betriebes ist die so genannte nassmechanische Aufbereitung oder Nasssortierung. Der gesamte Wasserkreislauf des Betriebes enthielt ein Volumen von ca. 100 m<sup>3</sup> und kann analog der Papierfabrik 2 als hoch geschlossener Wasserkreislauf bezeichnet werden. Die Zugabe von einem Liter Frischwasser pro gelben Sack mit 80 l Inhalt und einer Schüttdichte von 60 kg/m<sup>3</sup> wird benötigt.

In der nachmechanischen Aufbereitung werden die Verpackungen mit Wasser gewaschen. Das Waschwasser fließt in einem geschlossenen Reinigungskreislauf aus mehreren Aufbereitungsstufen wieder in ein Sammelbecken zurück. Dabei werden Papierfasern mit Hilfe eines Scheibenfilters abgetrennt und der Papierherstellung zugeführt. Die im Waschwasser enthaltenen Schmutzstoffe werden geflockt und als stichfester Schlamm ausgeflockt. Dabei wird eine Druckentspannungsflotation als Reinigungsstufe für einen Teilstrom von 70 m<sup>3</sup>/h Kreislaufwasser verwendet. Als Additive zur Flockung der Feststoffe wurden vor der Betriebsuntersuchung ein PACS (400 mg/L) und ein schwach kationisches Polyacrylamid (10 mg/L) zugegeben. Die Umstellung auf Dosierung von ANS bei gleichem Polyacrylamid (PAM) wurde am 02.12.2002 durchgeführt. Die Dosierung betrug ca. 350 mg/L ANS auf den Zulauf zur Flotation bezogen und wird volumenstromabhängig geregelt. Die Probennahme der Biofilmpuben erfolgte an der Wand der Druckentspannungsflotation von einer Stahloberfläche des Typs 1.4571. Die Wasserproben wurden während der Betriebsuntersuchung im geklärten Wasser der Druckentspannungsflotation gezogen.

### 3.7.4 Metallverarbeitender Betrieb

Im metallverarbeitenden Betrieb dient der Wasserkreislauf hauptsächlich zu Kühlzwecken. Mit flüssigem Metall gefüllte Behälter, die so genannten Kokillen, werden dabei mit Hilfe des Kühlwassers gekühlt. Über Wärmetauscher wird das Kreislaufwasser, nachdem es sich an den Kokillen aufgeheizt hat, wieder in der Temperatur abgesenkt. Durch Aufheizen des Kreislaufwassers an den Kokillen, kommt es kurzzeitig zu einem Temperaturanstieg auf über 100 °C. Nach Durchgang durch Wärmetauscher, liegt die Temperatur des Rücklaufwassers aus den Gießanlagen in der Reinigungsstufe bei ca. 35 – 45 °C. Nach der Reinigung in der Wasseraufbereitung und weiterer Abkühlung der Wassertemperatur auf ca. 27 °C wird das Wasser erneut zurück in die Gießanlagen transportiert, um die heißen Kokillen ein weiteres Mal zu kühlen.

Die eigene Frischwasseraufbereitung des metallverarbeitenden Betriebes speist kontinuierlich frisches Wasser in den Kreislauf ein. Aufgrund der Verdunstungsverluste im Wasserkreislauf kommt es jedoch zu einer Anreicherung von Anionen und Kationen im Wasser, die auch durch die Frischwassereinspeisung nicht kompensiert werden kann. Eine so genannte Abschlammung, das heißt Ausschleusen von Kreislaufwasser bei Erreichen eines definierten Wertes für die Leitfähigkeit und Ergänzung durch Frischwasser, ist deshalb diskontinuierlich notwendig. Der gesamte Wasserkreislauf des metallverarbeitenden Betriebes umfasst ein Volumen von ca. 2.000 m<sup>3</sup> Wasser.

Ein Teilstrom des Wasserkreislaufes wird, wie weiter oben bereits erwähnt, über eine Reinigungsstufe mit Flockung und anschließender Sedimentation geführt. Hier werden partikuläre Feststoffe, bei denen es sich hauptsächlich um Ruß handelt, abgetrennt. Für die Koagulation dieser Rußpartikel wurden bereits verschiedene Aluminiumsalzlösungen eingesetzt. Aufgrund der Aufkonzentrierung im Wasserkreislauf, ist die Dosierung von solchen Additiven zur Flockung in der Reinigungsstufe jedoch als problematisch zu bewerten, wenn Chlorid oder Sulfat als Anionen enthalten sind. Mögliche Konsequenzen, wie sie in Kapitel 1.3 ausführlich beschrieben sind, wären zu erwarten. Aufgrund einer Dosierung von PACS betrug der Chloridgehalt im Wasserkreislauf ca. 500 – 600 mg/L Chlorid. Da dies im Hinblick auf Korrosion von Edelstahlleitungen, wie sie im Betrieb verbaut wurden, nicht unbedenklich ist, musste die Chloridkonzentration verringert werden. Ziel der Umstellung von PACS auf ANS war deshalb die Senkung des Chloridgehaltes im metallverarbeitenden Betrieb bei mindestens gleich guter Reinigungsleistung in der Wasseraufbereitung. Die Probennahme der Biofilmpuben erfolgte an der Wand der

Schlammbehälter von einer Stahloberfläche des Typs 1.4571. Die Wasserproben wurden im geklärten Wasser nach der Reinigungsstufe entnommen.

### 3.7.5 Tabellarische Übersicht der vier Industriebetriebe

Zum besseren Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten vier Industriebetriebe sind ausgewählte Kenngrößen und Wasserparameter in der Tabelle 3.2 noch einmal zusammengefasst und gegenüberstellt.

Tabelle 3.2: Übersicht der vier untersuchten Industriebetriebe und Darstellung ausgewählter Kenngrößen und Parameter der Wasserkreislaufsysteme

Name	Papierfabrik 1	Papierfabrik 2	Recycling- betrieb	Metallver- arbeitender Betrieb
Abkürzung	PF 1	PF 2	RB	MvB
Wasserkreislauf- volumen [m³]	450	1000	100	2000
Spezifischer Wasserverbrauch [kg Wasser/kg Papier]	0,5	3,0	-	-
Produktion [t/a]	30.000	320.000	25.000	-
Rohstoff	100 % Altpapier	100 % Altpapier	Gelbe Säcke	Metall
Wasserreinigung	Flotation	Flotation	Flotation	Sedimentation
Temperatur [°C]	35	49	25 – 35	27 – 45
Leitfähigkeit [µS/cm]	18.000	2.500	2.500 – 3.500	3.000
pH-Wert [pH-Einheiten]	6,8	6,3	6,5 – 7,0	7,0 – 7,5
CSB-Gehalt [mg/L]	28.000	6.000 – 8.000	3.000	-
Chloridgehalt [mg/L]	1.500	250	600	500 – 600

## 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob man der Aufsalzung in Wasserkreislaufsystemen entgegenwirken kann, indem ein ANS als Koagulant zum Einsatz kommt, dessen Nitrat-Ionen anschließend im Wasserkreislauf durch Mikroorganismen abgebaut werden können. Zu diesem Zweck sollten ursächliche Zusammenhänge zwischen der Aktivität von Mikroorganismen und dem Umsatz von Nitrat in Wasserkreisläufen unter praxisrelevanten Bedingungen sowie in Laborsystemen aufgeklärt werden.

Insgesamt wurden vier Betriebsuntersuchungen mit ANS als Koagulant in Wasserkreisläufen von Industriebetrieben durchgeführt. Während der Betriebsuntersuchungen erfolgten sowohl chemische Wasseranalysen als auch mikrobiologische Biofilm- und Wasseranalysen. Weitergehende Untersuchungen einzelner Parameter, die den mikrobiellen Nitratabbau beeinflussen können, erfolgten in Laboruntersuchungen mit Batch-Reaktoren. Die Koagulations-eigenschaften des verwendeten ANS wurden mittels Laborversuchen analysiert und der Wirkung von anderen Koagulantien gegenübergestellt.

### 4.1 Ergebnisse der Flockungstests

Um die Eignung von ANS als Koagulant sicher zu stellen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Untersuchung der Koagulationseigenschaften als Jar-Test durchgeführt (Kapitel 3.3). Die Belastung des Wassers mit Trübstoffen bzw. feinst dispergierten Teilchen wurde dabei durch gepulverte Aktivkohle (100 mg/L) simuliert. Mit Hilfe eines Reihenrührgerätes (Abb. 3.1) konnten parallel vier verschiedenen Aluminium-salzlösungen einander gegenüber gestellt werden. Die Koagulationswirkung wurde im Hinblick auf die Geschwindigkeit der Flockenbildung, die Größe der gebildeten Flocken und die Sedimentationszeit der Hauptmenge an Flocken beurteilt (Tabelle 4.1).



Tabelle 4.1: Flockungstest einer Aktivkohle-Suspension (100 mg/L) mit verschiedenen Aluminiumsalzlösungen im Reihentrührgerät. PACS, Polyaluminiumchloridsulfat; PAC, Polyaluminiumchlorid; ANS, Aluminiumnitratsulfat; --, schlecht; +, gut; ++, sehr gut. Die Temperatur während des Versuches betrug 22 °C.

Flockungsmittel (FM)	Nullprobe	PACS	PAC Typ A	PAC Typ B	ANS
Dosierung FM [mg/L]	0	75	75	75	75
pH-Wert vor FM-Zugabe	7,74	7,74	7,74	7,74	7,74
pH-Wert nach FM-Zugabe	7,77	7,70	7,70	7,67	7,70
Flockenausbildung	--	+ / ++	++	+	++
Flockengröße [mm]	< 0,5	2,0 – 3,0	> 3,5	1,5 – 2,5	3,0 – 3,5
Sedimentationszeit der Hauptmenge [s]	> 100	35	25	55	25
Trübung vorher [TE/F]	18,35	18,35	18,35	18,35	18,35
Trübung des Überstandes nach 30 min [TE/F]	18,17	1,06	1,11	1,21	0,44

Alle vier getesteten Aluminiumsalzlösungen wiesen eine gute Koagulationswirkung im Hinblick auf die Entfernung von Trübstoffen auf. Während die ersten drei Polyaluminiumchlorid-Verbindungen Trübungswerte im Überstand nach 30 min Sedimentationszeit von 1,06 TE/F – 1,21 TE/F aufwiesen, konnte nach Behandlung der Aktivkohle-Suspension mit ANS eine niedrigere Trübung von 0,44 TE/F ermittelt werden. Dieses Ergebnis deutet auf eine bessere Koagulation der Aktivkohleteilchen bei Verwendung von ANS als Flockungsmittel hin.

Im Bezug auf die Flockengröße und die Sedimentationszeit der Hauptmenge an Flocken, wies das ANS ebenso gute Ergebnisse wie das beste Polyaluminiumchlorid im Test auf. Die Flockenausbildung war sehr gut, die Flockengröße betrug bis zu 3,5 mm und nach 25 s war die Hauptmenge der gebildeten Flocken im Becherglas sedimentiert.

## 4.2 Chemische Analysen aus den Betriebsuntersuchungen

In dieser Arbeit wurden vier Betriebsuntersuchungen mit ANS als Koagulant in Wasserkreisläufen von Industriebetrieben durchgeführt. Bei den untersuchten Betrieben handelte es sich um zwei Papierfabriken, ein Recyclingunternehmen und einen metallverarbeitenden Betrieb. Zunächst sind die Ergebnisse der chemischen Wasseranalysen dargestellt, anschließend folgen dann die Ergebnisse der mikrobiologischen Analysen.

### 4.2.1 Papierfabrik 1

Der komplett geschlossene Wasserkreislauf in der Papierfabrik 1 (Kapitel 3.7.1) hatte aufgrund von Altpapiereinsatz und der Dosierung von chemischen Additiven hohe Salzkonzentrationen im Wasser zur Folge. Insbesondere der hohe Chloridgehalt von ca. 1.500 mg/L Chlorid wurde kritisch betrachtet, da die Werkstoffbeständigkeit von hochlegierten Edelstählen bei Werten > 500 mg/L Chlorid im Bezug auf Korrosion nicht mehr gegeben ist. Ziel der Betriebsuntersuchung war daher die Konzentration von gelösten Ionen, und hier insbesondere Chlorid, im Wasserkreislaufsystem zu senken. Erreichen wollte man dies durch einen Ersatz von PACS durch ANS. Die unterschiedliche chemische Zusammensetzung der beiden Aluminiumsalzlösungen ist in Tabelle 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2: Chemische Zusammensetzung der beiden Aluminiumsalzlösungen, die in den vier untersuchten Betrieben als Koagulant eingesetzt wurden.

Aluminiumsalzlösung	Aluminium [mg/L]	Chlorid [mg/L]	Nitrat [mg/L]	Sulfat [mg/L]
PACS <sup>1)</sup>	54	100	0	30
ANS <sup>2)</sup>	54	0	160	30

1) PACS: Polyaluminiumchloridsulfat

2) ANS: Aluminiumnitratsulfat

Beide Aluminiumsalzlösungen enthielten denselben Aluminium-Gehalt von 54 g/L und 30 g/L für Sulfat-Ionen, aber unterschiedliche Konzentrationen für die Chlorid- bzw. Nitrat-Ionen. Im PACS war kein Nitrat, dafür aber 100 mg/L Chlorid enthalten und im ANS war kein Chlorid, sondern 160 mg/L Nitrat enthalten.

Die Betriebsuntersuchung wurde insgesamt 10 Wochen lang durch Wasseranalysen aus dem Wasserkreislauf dokumentiert. Beprobt wurde dabei das geklärte Wasser aus der zweiten Druckentspannungsflotation, welches betriebsintern als so

genanntes „Klarwasser“ bezeichnet wird, da es weitgehend von Papierfasern befreit ist. Zu den Parametern, die für eine Untersuchung ausgewählt wurden, zählten die Leitfähigkeit als Summenparameter für alle gelösten ionischen Verbindungen und die Chloridkonzentration wegen ihrer Bedeutung für die Werkstoff-Korrosion. Um Veränderung bei den gelösten Stickstoffverbindungen zu untersuchen, wurden auch die Ammonium-, Nitrit- und Nitratkonzentration im Klarwasser analysiert. Als Maß für die Reinigungsleistung der eingesetzten Aluminiumsalzlösung, wurde sowohl die Trübung des Klarwassers als auch der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) analysiert. Der CSB-Wert gilt als ein Summenparameter für die Belastung von Wassersystemen mit gelösten und ungelösten organischen Substanzen (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Veränderung ausgewählter Parameter nach dem Wechsel von Polyaluminiumchloridsulfat auf Aluminiumnitratsulfat (ANS) im Wasserkreislauf der Papierfabrik 1. Vor der Dosierung von ANS ist die Schwankungsbreite mehrerer Einzelmessungen angegeben. Nach Dosierung von ANS ist die Schwankungsbreite von Analysen aus einem 60-tägigen Versuchszeitraum angegeben.

Parameter	Vor Dosierung ANS	Nach Dosierung ANS
Temperatur [°C]	34,0 – 36,0	34,0 – 36,0
pH-Wert [pH]	6,7 – 6,9	6,7 – 6,9
Leitfähigkeit [mS/cm]	16,0 – 20,0	10,0 – 12,8
CSB-Wert [mg/L O <sub>2</sub> ]	25.000 – 35.000	17.000 – 22.000
Nitrat [mg/L]	40,0 – 50,0	20,0 – 40,0
Chlorid [mg/L]	1.300 – 1.500	350 – 500

Während des gesamten Versuchszeitraumes blieben die Temperatur und der pH-Wert im Wasserkreislauf der Papierfabrik 1 relativ konstant und zeigten keine auffälligen Veränderungen (Tabelle 4.2). Die Temperatur lag bei ca. 35 °C und der pH-Wert bei ca. 6,8. Die Sauerstoffgehalte im Klarwasser der Papierfabrik 1 betrugen im Auslauf der zweiten Flotationsstufe 0,5 mg/L O<sub>2</sub>.

Die Ergebnisse der Analysen für die Chlorid-Konzentration und Leitfähigkeit im Wasserkreislaufsystem der Papierfabrik 1 sind in Abbildung 4.1 grafisch dargestellt. Zu berücksichtigen ist, dass betriebsbedingt die Produktion nur an Werktagen von Montag bis Freitag stattgefunden hat und es an Wochenenden regelmäßig zu Produktionsstillständen kam. Wasseranalysen wurden stets dann durchgeführt, wenn auch in der Papierfabrik 1 produziert wurde.

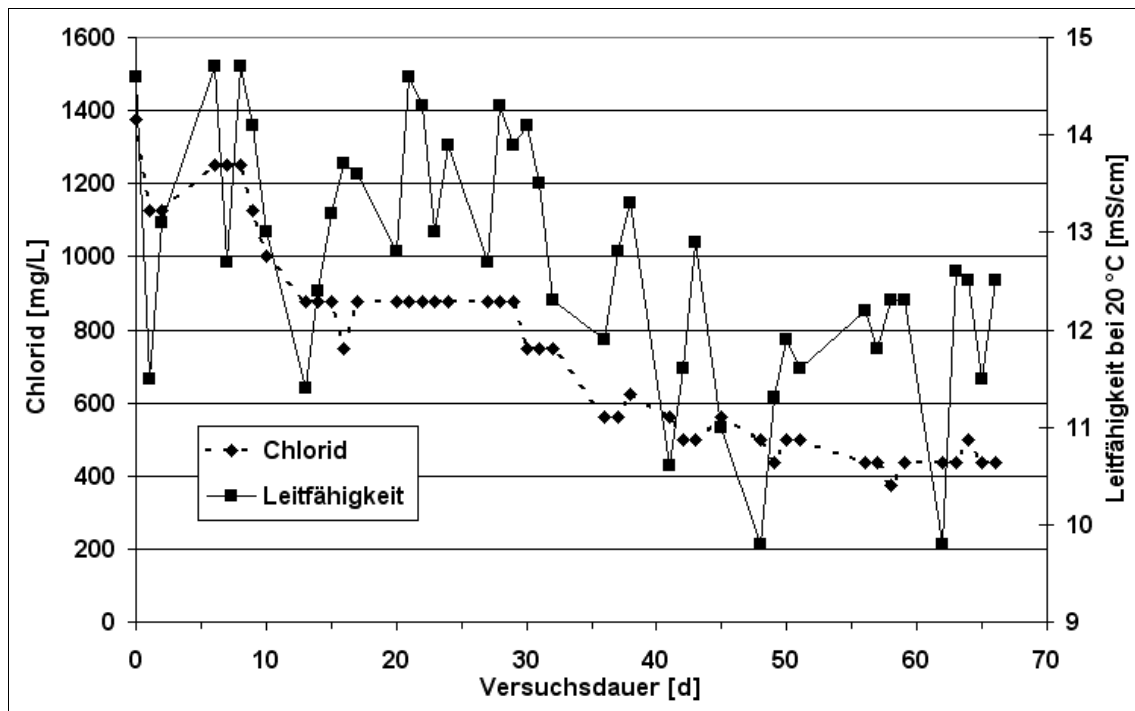


Abbildung 4.1: Chloridkonzentration und Leitfähigkeit im Klarwasser der Papierfabrik 1 während der Dosierung von Aluminiumnitratsulfat.

Nach einer zweiwöchigen Übergangsphase zu Beginn der Betriebsuntersuchung, in der ANS und PACS an zwei unterschiedlichen Dosierstellen parallel verwendet wurden, kam das ANS ab dem 14. Tag ausschließlich als Störstoff- und Feinstofffixiermittel an der Papiermaschine zum Einsatz. Innerhalb der Versuchsdauer, mit Beginn der Dosierung von ANS, nahmen die Leitfähigkeit und der Chloridgehalt ab. Während des 60-tägigen Zeitraumes sank die Chloridkonzentration von ca. 1.400 mg/L Chlorid auf ca. 400 mg/L Chlorid ab. Dies entspricht einer prozentualen Abnahme der Chloridkonzentration im Vergleich zum Ausgangswert von ca. 70 %. Die Leitfähigkeit als Summenparameter aller ionischen Verbindungen verringerte sich innerhalb der Versuchsdauer von anfangs ca. 15 mS/cm bis auf einen Wert von ca. 12 mS/cm am Ende des Versuches.

Neben dieser Abnahme bei der Chlorid-Konzentration und der Leitfähigkeit, ist in Abbildung 4.1 ebenfalls erkennbar, dass die Schwankungen bei der Chlorid-Konzentration deutlich weniger ausgeprägt sind, als dies bei den Werten für die Leitfähigkeit der Fall ist. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass es neben dem Chloridgehalt noch weitere Faktoren zu geben scheint, die den Salzgehalt im Wasserkreislauf beeinflussen.

Die Messergebnisse für die Nitrat-, Nitrit- und Ammonium-Konzentration innerhalb des Versuchszeitraumes sind in Abbildung 4.2 grafisch wiedergegeben. Mit Beginn

der Dosierung von ANS wurden innerhalb der ersten Tage der Betriebsuntersuchung steigende Nitratkonzentrationen bis auf 160 mg/L Nitrat gemessen.

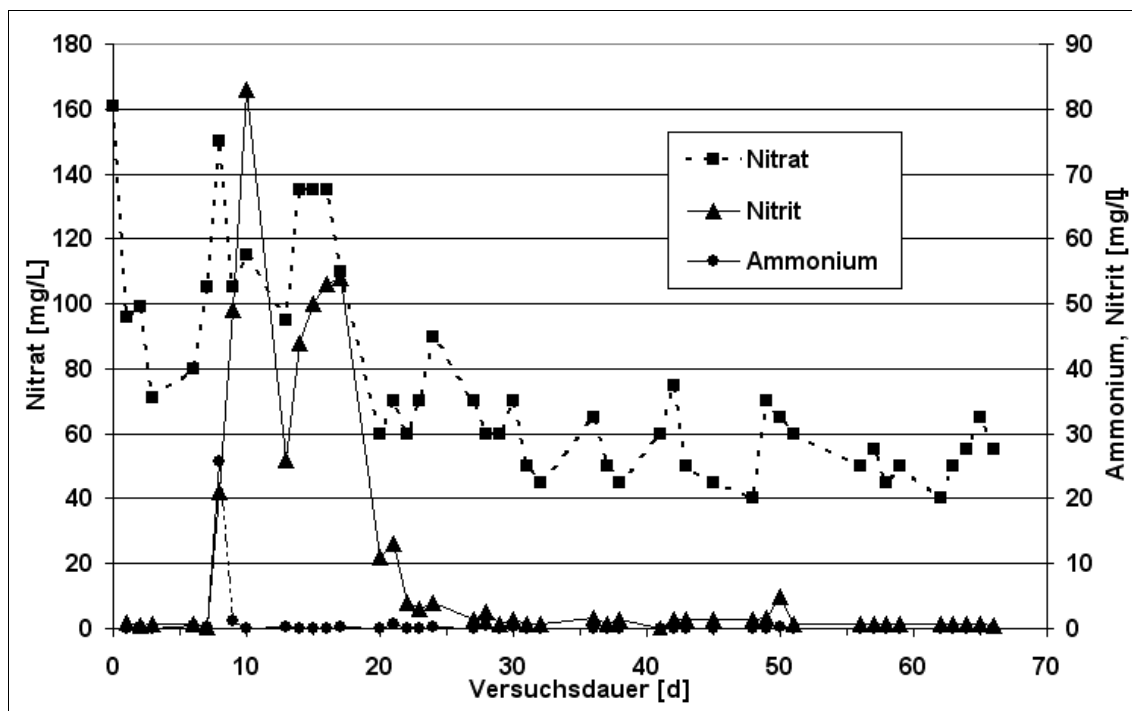


Abbildung 4.2: Ammonium-, Nitrat- und Nitrit-Konzentration im Klarwasser der Papierfabrik 1 während der Dosierung von Aluminiumnitratsulfat.

Diese anfänglichen, hohen Werte für die Nitratkonzentration verringerten sich jedoch innerhalb von wenigen Tagen wieder, um danach erneut anzusteigen. Dieser Verlauf konnte innerhalb der ersten 40 Versuchstage mehrmals dokumentiert werden und führte zur Ausbildung von mehreren Maxima in der Nitratkonzentration, die aber in ihren Amplituden mit zunehmender Versuchsdauer abnehmen. Betrachtet man den gesamten Analysenzeitraum von 70 Tagen, so ist eine Abnahme von Spitzenwerten im Anfang von ca. 150 mg/L Nitrat auf ca. 50 mg/L Nitrat erkennbar. Für die Nitrit- und die Ammonium-Konzentration konnten meist relativ niedrige Werte < 5 mg/L bestimmt werden. Doch insbesondere zu Beginn der ANS-Dosierung gab es ab dem 14. Versuchstag eine kurze Periode mit erhöhten Werten für die Nitrit-Konzentration (20 – 80 mg/L Nitrit) und einmalig am 16. Tag wurden auch für die Ammonium-Konzentration (25 mg/L Ammonium) höhere Werte erhalten. Während der restlichen Versuchsdauer wurden für die Ammonium-Konzentration keine erhöhten Werte mehr bestimmt, während für die Nitrit-Konzentration noch dreimal kurzzeitig erhöhte Werte gemessen wurden, wie es z. B. am 50. Tag der Fall gewesen ist. Der bei der Nitratkonzentration beschriebene Effekt der abnehmenden Amplitude der Maxima, konnte auch beim Verlauf der Nitrit-Konzentration beobachtet werden.

In Abbildung 4.3 ist der Verlauf der CSB-Werte im zweimonatigen Versuchszeitraum mit Dosierung von ANS grafisch dargestellt. Die Messwerte wurden in der homogenisierten Klarwasserprobe aus dem Ablauf der zweiten Flotationsstufe ermittelt. Durch die beiden Flotationsstufen, in denen feinstverteilte Luftbläschen in das Wasser eingetragen wurden, um Feinstoffe zu flotieren, sollten kolloidale Stoffe bereits möglichst weitgehend abgetrennt worden sein.

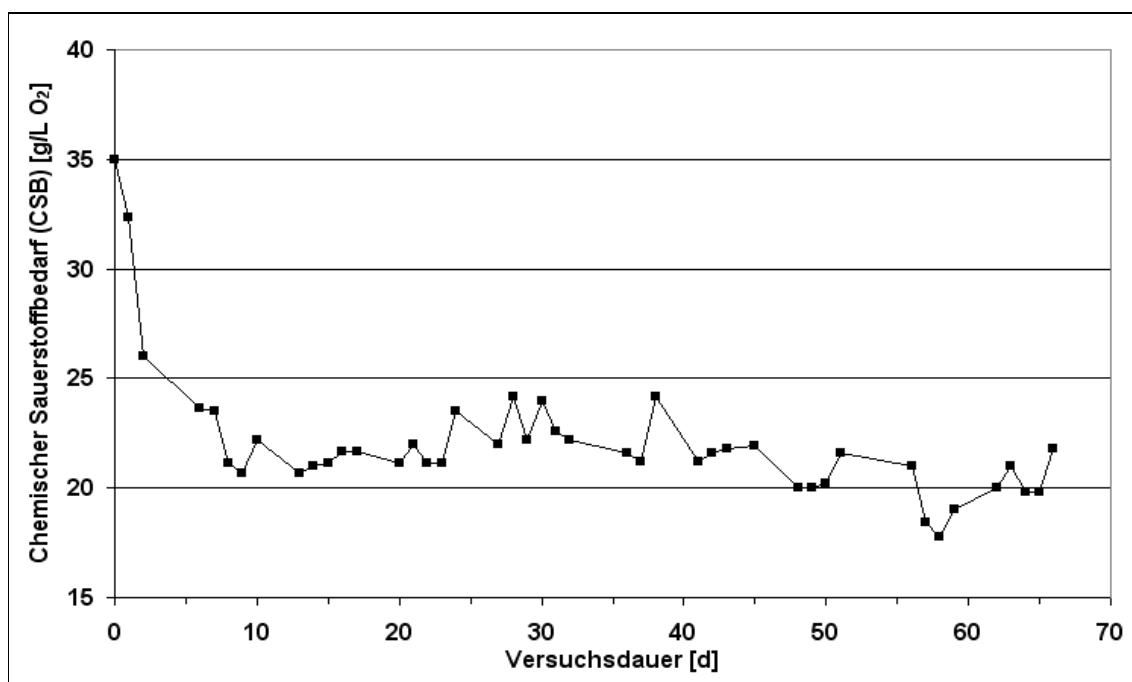


Abbildung 4.3: CSB-Werte im Klarwasser der Papierfabrik 1 während der Dosierung von Aluminiumnitratsulfat.

Besonders auffällig sind in Abbildung 4.3 die stark abnehmenden Messwerte in den ersten Tagen des Betriebsversuches. Hier nahm der CSB-Wert von anfangs 35 mg/L O<sub>2</sub> innerhalb von sechs Tagen auf ca. 24 mg/L O<sub>2</sub> ab und dann in den folgenden sieben Wochen sank er weiter auf ca. 20 – 21 mg/L O<sub>2</sub>.

Der Gehalt an Trübstoffen im Klarwasser der Papierfabrik 1 wurde über den gesamten Versuchszeitraum hinweg mit Hilfe eines Streulichtphotometers analysiert (Abbildung 4.4).

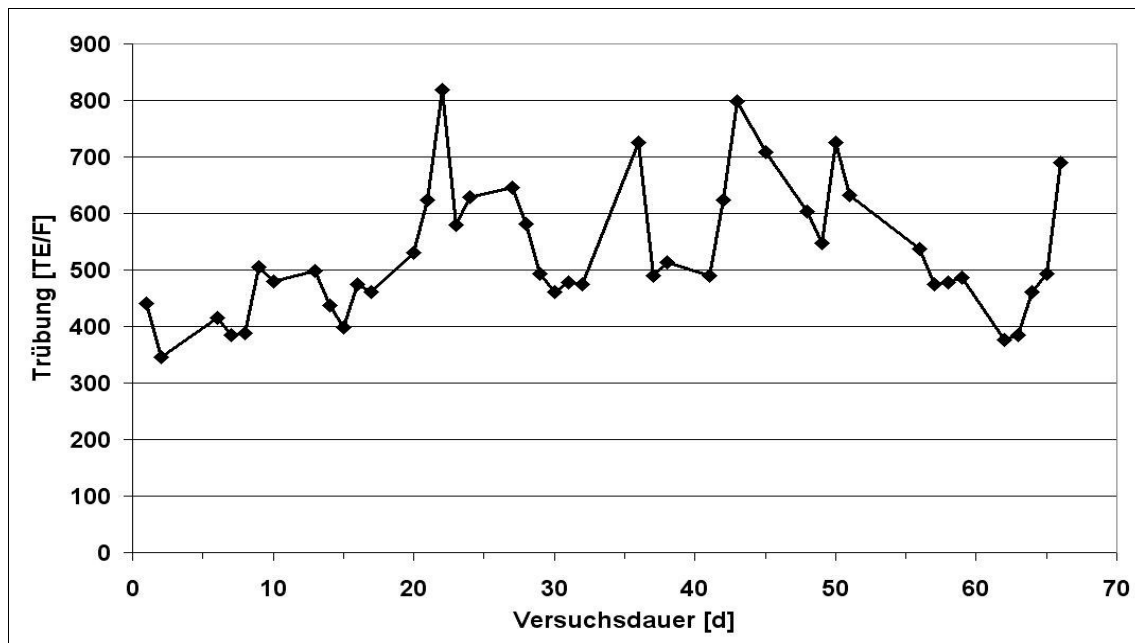


Abbildung 4.4: Trübung im Klarwasser der Papierfabrik 1 während der Dosierung von Aluminiumnitratsulfat.

Die Messwerte in Abbildung 4.4 zeigen keinen klaren Trend für die Trübungswerte. Aufgrund der starken Schwankungen von 100 – 200 TE/F innerhalb von einem Tag, lassen sich keine Rückschlüsse aus diesen Werten für die Wasserqualität ableiten. Somit war aber auch kein negativer Einfluss auf die Trübung nach der Umstellung auf ANS feststellbar.

#### 4.2.2 Papierfabrik 2

Bei der Papierfabrik 2 handelt es sich im Gegensatz zur Papierfabrik 1 nicht um einen komplett geschlossenen Wasserkreislauf, sondern um einen hoch geschlossenen Kreislauf, der Wassermengen aus seinem Kreislauf ausschleust. Aufgrund einer Geheimhaltungsvereinbarung können an dieser Stelle nur allgemeine Angaben zu den Ergebnissen gemacht werden und es wird auf die Darstellung von Einzelwerten, wie im Falle der vorangegangenen Betriebsuntersuchung in der Papierfabrik 1, verzichtet. Die Zusammenfassung der Messwerte ist für ausgewählte Parameter in Tabelle 4.4 gegeben.

Tabelle 4.4: Veränderung ausgewählter Parameter nach dem Wechsel von Polyaluminiumchloridsulfat (PACS) auf Aluminiumnitratsulfat (ANS) im Wasserkreislauf der Papierfabrik 2. Alle Angaben sind Durchschnittswerte bzw. Schwankungsbreiten aus Analysen eines 30-tägigen Versuchszeitraumes; n. b., nicht bestimmt.

Parameter	Vor Dosierung ANS	Nach Dosierung ANS
Temperatur [°C]	49,0	49,0
pH-Wert [pH]	6,7	6,7
Leitfähigkeit [mS/cm]	2,5	2,5
CSB-Wert [mg/L O <sub>2</sub> ]	6.500 – 8.500	6.000 – 8.000
BSB <sub>5</sub> [mg/L]	1.500 – 2.000	n. b.
Nitrat [mg/L]	20	20
Chlorid [mg/L]	250	175

Erkennbar ist, dass genau wie bei der Betriebsuntersuchung in der Papierfabrik 1, die Temperatur und der pH-Wert von der Umstellung der Aluminiumsalzlösung unbeeinflusst blieben. Bemerkenswert ist hier jedoch die Kreislaufwassertemperatur von 49,0 °C, die deutlich höher ist, als dies bei vergleichbaren Betrieben der Fall ist. Auch die Leitfähigkeit zeigte wenig Veränderung, sie blieb unverändert bei ca. 2,5 mS/cm. Der CSB-Wert dagegen nahm um ca. 500 mg/L O<sub>2</sub> durch die Umstellung von PACS auf ANS ab.

Die Nitratkonzentration während der Dosierung von ANS im Vergleich zur Dosierung von PACS wies im Gegensatz zu dem Betriebsversuch in der Papierfabrik 1 keine Veränderung auf, sondern sie blieb relativ konstant bei ca. 20 mg/L Nitrat. Der Chloridwert fiel nach der Umstellung der Aluminiumsalzlösung von ca. 250 mg/L auf ca. 175 mg/L Chlorid ab.

#### 4.2.3 Recyclingbetrieb

Der Betrieb zur Wiederverwertung von Reststoffen war ebenfalls ein hoch geschlossener Wasserkreislauf in Analogie zu Papierfabrik 2. Hier verwendete man PACS vor der Umstellung auf ANS zur Koagulation an der Druckentspannungsflotation und hatte demzufolge im Klarwasser hohe Chloridgehalte von ca. 800 bis 1200 mg/L (Tabelle 4.5).



Tabelle 4.5: Veränderung ausgewählter Parameter nach dem Wechsel von Polyaluminiumchloridsulfat (PACS) auf Aluminiumnitratsulfat (ANS) im Wasserkreislauf der Recyclingbetriebses. Die Angaben vor und nach der Dosierung von ANS sind Schwankungsbreiten aus Analysen eines 120-tägigen Versuchszeitraumes.

Parameter	Vor Dosierung ANS	Nach Dosierung ANS
Temperatur [°C]	25,0 – 33,0	25,0 – 33,0
pH-Wert [pH]	6,5 – 7,5	6,5 – 7,5
Leitfähigkeit [mS/cm]	2,0 – 4,5	2,0 – 3,0
CSB-Wert [mg/L O <sub>2</sub> ]	2.000 – 5.000	2.000 – 5.000
Nitrat [mg/L]	40 – 50	20 – 40
Chlorid [mg/L]	800 – 1.200	190 – 450

Als Klarwasser bezeichnet man in diesem Betrieb das von den Feststoffen befreite Wasser im Ablauf der Flotationsanlage. Die Umstellung auf Dosierung von ANS erfolgte für insgesamt 78 Tage. Im Anschluss daran wurde wieder zurück auf das zuvor verwendete PACS umgestellt (Abbildung 4.5).

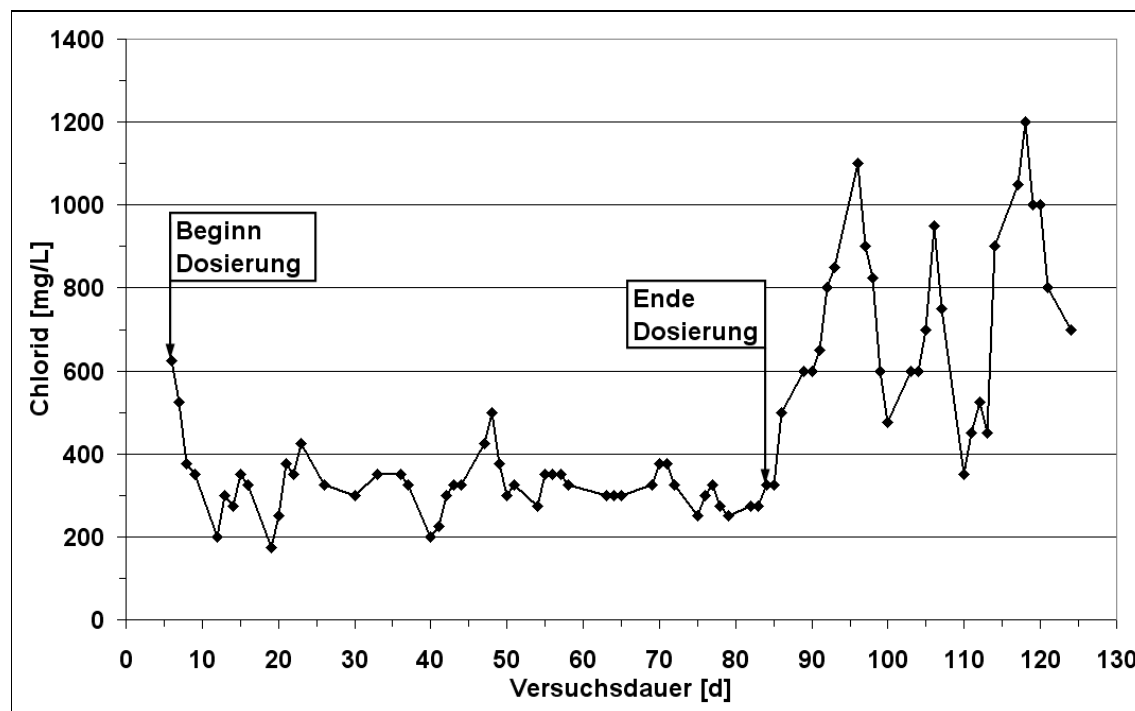


Abbildung 4.5: Chloridkonzentration im Klarwasser während und nach dem Betriebsversuch mit Aluminiumnitratsulfat. Beginn und Ende der Dosierung von ANS sind markiert.

Mit fortlaufender Dosierung verringerte sich zu Beginn des Versuches der Chloridgehalt im Klarwasser auf ca. 300 mg/L Chlorid und stieg erst nach Beendigung der Dosierung am 84. Tag wieder auf Werte von ca. 500 mg/L bis zu 1.000 mg/L Chlorid an, wobei im Mittel ca. 700 mg/L Chlorid gemessen wurden.

Die Schwankungen bei der Chloridkonzentration sind mit dem relativ kleinen Kreislaufwasservolumen von nur 100 m<sup>3</sup> und den vergleichsweise großen Zusatzmengen an Frischwasser mit niedrigem Chloridgehalt (< 100 mg/L Chlorid) zu erklären. Denn bei großen Zugabemengen an Frischwasser wurde der Chloridgehalt im Wasserkreislauf so relativ schnell herabgesetzt.

Der Verlauf für die Nitrat-, Nitrit- und Ammonium-Konzentrationen innerhalb von 58 Tagen zu Beginn des Versuches ist in Abbildung 4.6 gezeigt. Danach wurden keine Analysenwerte mehr für die drei Stickstoff-Parameter bestimmt. Erkennbar ist, dass der Ammoniumgehalt im Klarwasser mit wenigen Ausnahmen, über den gesamten untersuchten Zeitraum hinweg deutlich < 5 mg/L Ammonium lag. Das Gleiche gilt für die Nitritkonzentration, auch sie blieb meist < 5 mg/L Nitrit im Klarwasser.

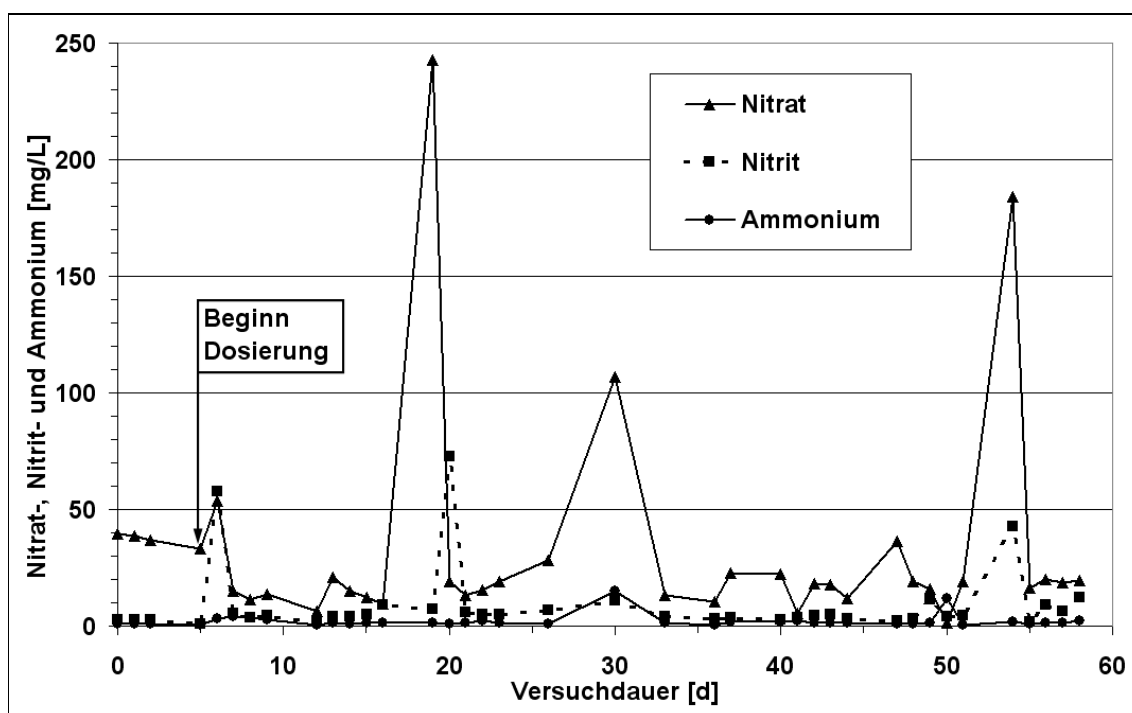


Abbildung 4.6: Nitrat-, Nitrit- und Ammonium-Konzentration im Klarwasser während des Versuchzeitraumes von 58 Tagen. Beginn der Dosierung von ANS ist markiert. Das Ende der Dosierung am 84. Tag ist in dieser Grafik nicht enthalten, da die Aufzeichnung der Messwerte nur bis zum 58. Tag erfolgte.

Während des untersuchten Zeitraumes von insgesamt 58 Tagen wurden nur dreimal leicht erhöhte Konzentrationen für Nitrit gemessen (Abbildung 4.6). Jede dieser erhöhten Nitritkonzentrationen war auch mit einer Erhöhung der Nitratkonzentration verbunden. Während der Nitratgehalt im Klarwasser meist bei ca. 20 mg/L Nitrat lag, stieg er bei diesen Ereignissen über 50 mg/L Nitrat an und bei einer Analyse wurde sogar ein Spitzenwert von 250 mg/L Nitrat ermittelt. Doch bereits am nächsten Tag waren die erhöhten Konzentrationen für Nitrat und auch Nitrit im Klarwasser nicht mehr nachweisbar. Die erhöhten Konzentrationen wurden stets nach Betriebsstillständen erhalten, wie z. B. nach dem Wochenende oder nach Feiertagen.

Auffällig war auch, dass in den ersten Tagen, nach der begonnenen Dosierung von ANS, keine täglich ansteigenden Nitratkonzentrationen im Klarwasser festgestellt werden konnten. Es wurde lediglich eine leicht erhöhte Nitratkonzentration von 40 mg/L Nitrat am Tag nach der Dosierung von ANS im Klarwasser ermittelt. In den darauf folgenden Tagen konnte sogar eine abnehmende Tendenz für den Nitratgehalt festgestellt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit standen im Bezug auf die Leitfähigkeit, den CSB-Wert, die Trübung und die absetzbaren Stoffe, deutlich mehr Analysenwerte zur Verfügung, da diese Parameter im Rahmen der täglichen betriebsinternen Analytik gemessen wurden.

Während der Dosierung von PACS in den 120 Tagen vor Beginn der Dosierung von ANS, wurden Leitfähigkeitswerte von im Mittel ca. 3,5 mS/cm gemessen (Abbildung 4.7). Nach Umstellung von PACS auf ANS zeigte sich bei der Leitfähigkeit eine leichte Abnahme auf ca. 2,5 mS/cm. Der Anstieg der Leitfähigkeit war insbesondere nach dem Ende der Dosierung von ANS und dem Wechsel zur Dosierung von PACS gut erkennbar. Auffällig bei den Analysen zur Leitfähigkeit waren die täglichen Schwankungen.

Die gleiche Beobachtung von täglich schwankenden Analysenwerten fand sich auch bei der Trübung und insbesondere beim CSB-Wert. Hier war allerdings im Gegensatz zur Leitfähigkeit, über den gesamten Zeitraum der Analysen keine deutliche Tendenz zu steigenden oder abnehmenden Werten erkennbar (Abbildung 4.8).

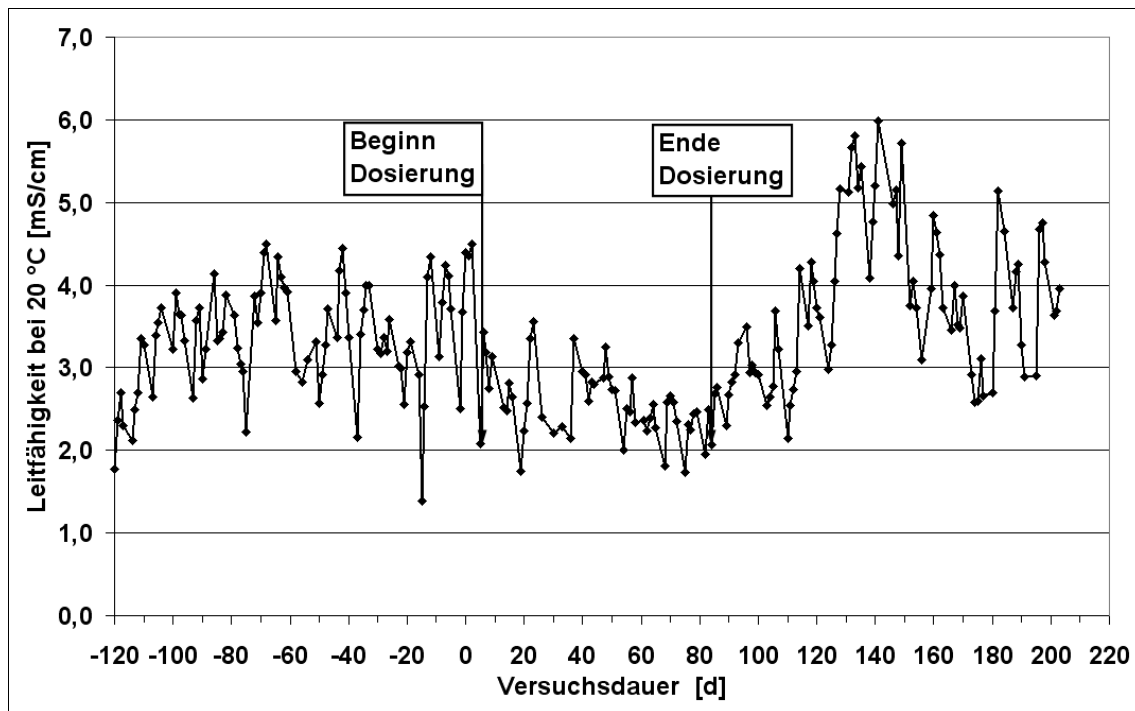


Abbildung 4.7: Leitfähigkeit bei 20°C im Klarwasser innerhalb einer 330-tägigen Periode. Beginn und Ende der Dosierung von ANS sind markiert.

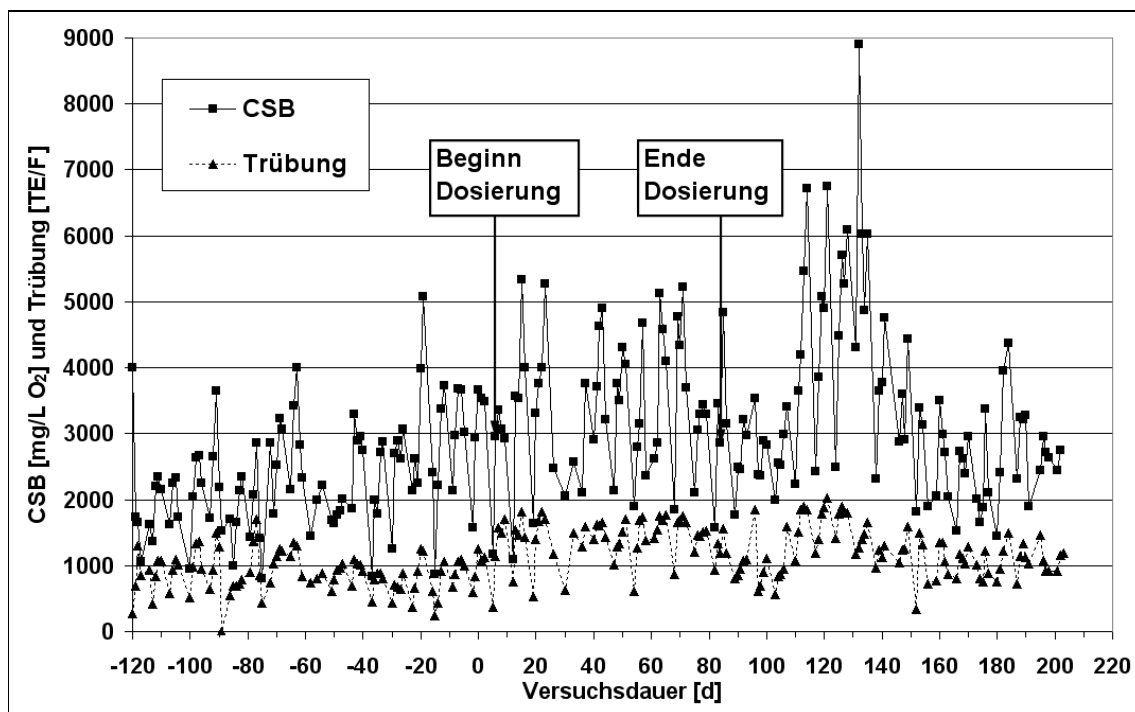


Abbildung 4.8: CSB und Trübung im Klarwasser innerhalb einer 330-tägigen Periode. Beginn und Ende der Dosierung von Aluminiumnitratsulfat sind markiert.

Zu Beginn und am Ende der Dosierung von ANS zeigte sich keine signifikante Veränderung bei den Summenparametern CSB-Wert oder Trübung. Vielmehr wurde im gesamten untersuchten Zeitraum eine täglich stark schwankende Trübung von im Mittel ca. 1.000 TE/F bestimmt und der CSB-Wert lag im Klarwasser im gleichen Zeitraum ebenfalls mit starken täglichen Schwankungen bei ca. 3.000 mg/L O<sub>2</sub>.

In Abbildung 4.9 sind die absetzbaren Feststoffe im Klarwasser dargestellt. Sie sind ein Maß für die Reinigungsleistung der Druckentspannungsflotation und zeigten während des gesamten untersuchten Zeitraumes von 330 Tagen keine signifikanten Auffälligkeiten, die auf die Umstellung des Koagulanten von PACS auf ANS zurückzuführen waren.

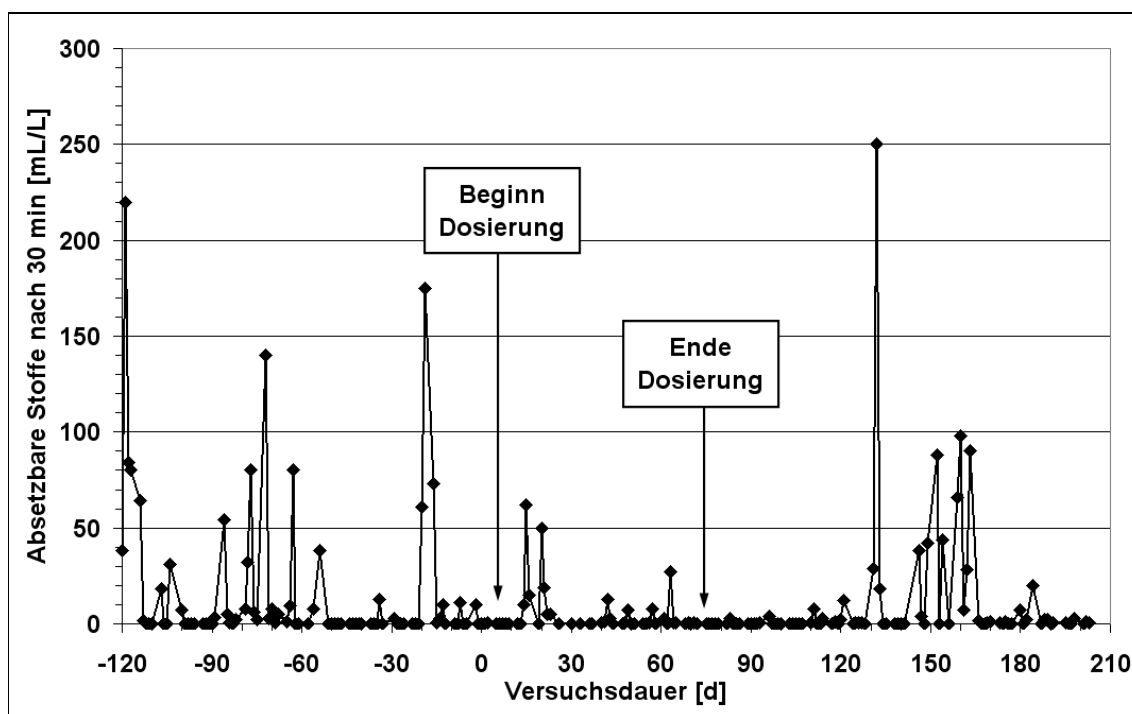


Abbildung 4.9: Absetzbare Feststoffe im Klarwasser innerhalb einer 330-tägigen Periode. Beginn und Ende der Dosierung von Aluminiumnitratsulfat sind markiert.

Die in Abbildung 4.9 erkennbaren vereinzelten Maxima für die absetzbaren Feststoffe konnten jeweils durch produktionsbedingte oder anlagentechnische Störungen erklärt werden.

#### 4.2.4 Metallverarbeitender Betrieb

Im Fall des metallverarbeitenden Betriebs handelte es sich um einen Wasserkreislauf, dem kontinuierlich Frischwasser zugegeben wurde, um die Leitfähigkeit auf einem relativ konstanten Niveau zu halten. Die Zugabe von Flockungsmitteln und das Einleiten von diversen Abwässern aus der Produktion bewirkte eine regelmäßige Aufsalzung im Kreislaufwasser. Um dem entgegenzuwirken, wollte man durch den Einsatz von ANS den Chloridgehalt im Kreislaufwasser senken. Die Zusammenfassung der Messwerte ist für ausgewählte Parameter in Tabelle 4.6 dargestellt.

Tabelle 4.6: Veränderung ausgewählter Parameter nach dem Wechsel von Polyaluminiumchloridsulfat (PACS) auf Aluminiumnitratsulfat (ANS) im Wasserkreislauf der metallverarbeitenden Betriebes. Die Angaben vor und nach der Dosierung von ANS sind Schwankungsbreiten aus Analysen eines 850-tägigen Versuchszeitraumes.

Parameter	Vor Dosierung ANS	Nach Dosierung ANS
Temperatur [°C]	25,0 – 37,0	25,0 – 37,0
pH-Wert [pH]	7,5 – 8,2	7,5 – 8,2
Leitfähigkeit [mS/cm]	2,5 – 3,5	2,5 – 3,5
Nitrat [mg/L]	40 – 50	450 – 700
Chlorid [mg/L]	450 – 600	130 – 150

Im metallverarbeitenden Betrieb wurden insgesamt zwei Versuche mit Dosierung von ANS durchgeführt. Zunächst erfolgte ein einmonatiger Kurzzeitversuch mit Dosierung von ANS als Koagulant in der Reinigungsstufe, um die Reinigungsleistung des Additivs zu bewerten. Im Anschluss daran wurde umgestellt auf die alte Dosierung von PACS für ca. 100 Tage. Danach wurde ein Langzeitversuch mit einer kontinuierlichen Dosierung von ANS durchgeführt, um die erhaltenen Ergebnisse den Werten während der Dosierung von PACS gegenüberstellen zu können (Abbildung 4.10).

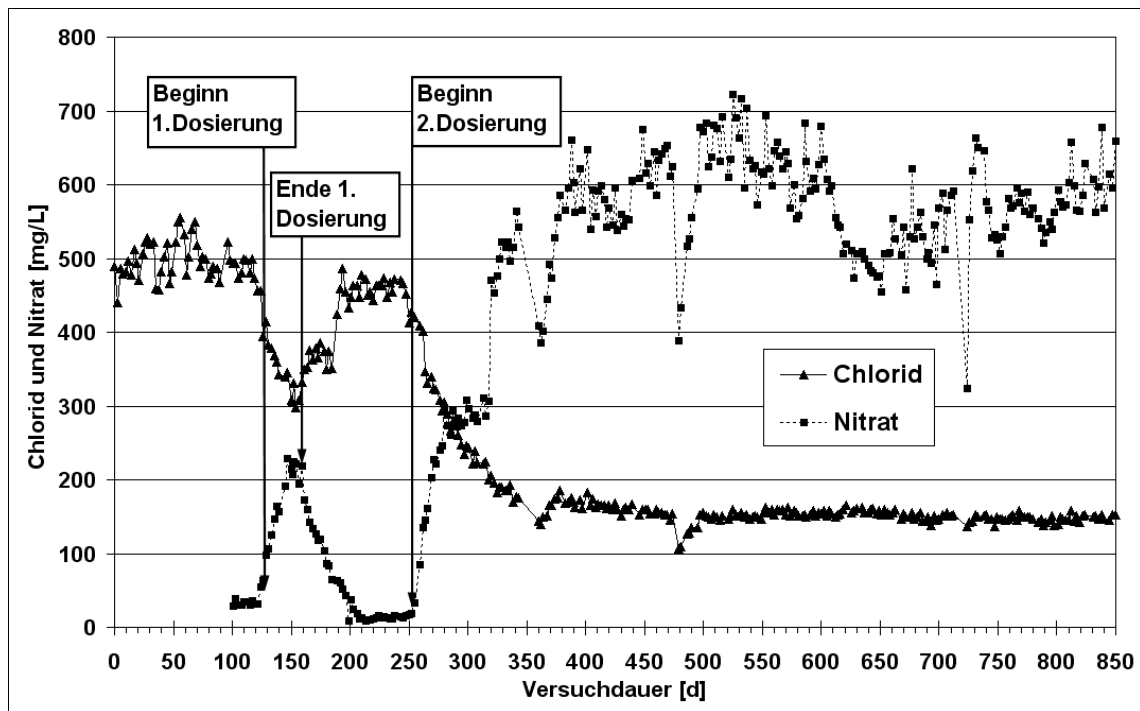


Abbildung 4.10: Chlorid- und Nitratkonzentration im Wasserkreislauf des metallverarbeitenden Betriebes. Beginn und Ende der Dosierung von Aluminiumnitratsulfat sind markiert.

Während der Dosierung von PACS in den ersten 120 Tagen blieb die Chlorid-Konzentrationen mit Schwankungen von  $\pm 50$  mg/L bei ca. 500 mg/L Chlorid und lag relativ konstant bei ca. 30 mg/L Nitrat.

Während des 30-tägigen Kurzzeitversuches mit Dosierung von ANS ab dem 122. Tag, wurde bezüglich der Chlorid-Konzentration eine Abnahme von 500 mg/L Chlorid bis auf ca. 300 mg/L Chlorid beobachtet. Parallel stieg der Nitratgehalt im Kreislaufwasser von ca. 30 mg/L Nitrat auf ca. 220 mg/L Nitrat innerhalb dieses einmonatigen Versuchszeitraumes an.

Da während der ersten Umstellung des Koagulanten keine Probleme in der Wasseraufbereitung auftraten, wie z. B. eine schlechte Absetzleistung in der Sedimentationsstufe oder das Auftreten von Trübungsdurchbrüchen, wurde die Reinigungsleistung der Flockung und Sedimentation während dieser 30-tägigen Dosierung vom Betriebspersonal als sehr gut eingestuft. Aufgrund dieses Vorversuches mit ANS, wurde ab dem 245. Versuchstag ein Langzeitversuch begonnen, um die vollständigen Auswirkungen der Umstellung des Koagulanten auf den Wasserkreislauf mit einem Gesamtvolumen von ca. 2000 m<sup>3</sup> beobachten zu können.

Genau wie zuvor beim Kurzzeitversuch beobachtet, fiel der Chloridgehalt im Wasserkreislauf deutlich ab. Innerhalb von 110 Tagen nahm er von 450 mg/L Chlorid bis auf 140 mg/L Chlorid ab. Die Nitratkonzentration stieg innerhalb des gleichen Zeitraumes von 110 Tagen von Werten < 20 mg/L Nitrat bis auf 560 mg/L Nitrat an. Während der kontinuierlichen Dosierung von ANS bis zum 850. Tag blieb die Nitratkonzentration mit einigen wenigen Ausnahmen im Bereich von 450 – 700 mg/L Nitrat im Kreislaufwasser und der Chloridgehalt betrug relativ konstant ca. 150 mg/L Chlorid.

Ein Teilstrom des Kreislaufwassers wurde im metallverarbeitenden Betrieb über die Reinigungsstufe geführt und dort von partikulärem Material befreit, das hauptsächlich aus Russpartikeln bestand. Obwohl die Belastung mit absetzbaren Feststoffen im Umlaufwasser, also im Zulauf zur Reinigungsstufe, stark schwankte, konnten im Ablauf der Reinigungsstufe meist niedrige Werte < 5 mg/L absetzbare Feststoffe gemessen werden (Abbildung 4.11).

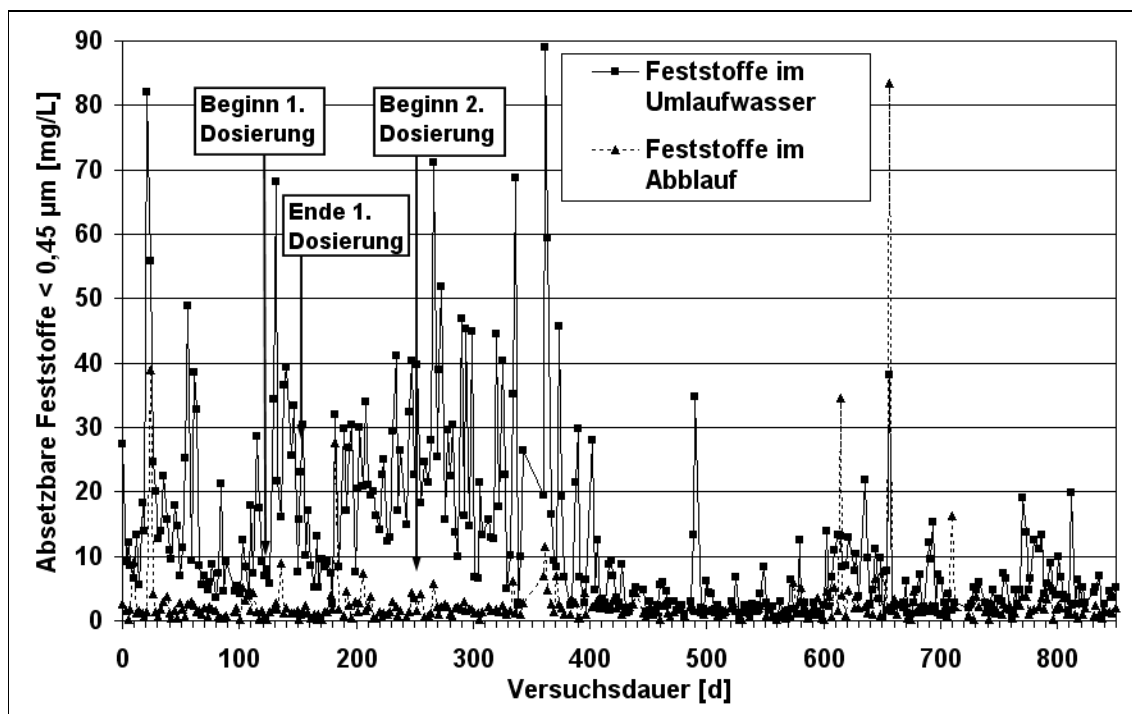


Abbildung 4.11: Absetzbare Feststoffe im Umlaufwasser und im Ablauf der Reinigungsstufe des metallverarbeitenden Betriebes.

Ein Einfluss der unterschiedlichen Aluminiumsalzlösung auf die im Wasser enthaltenen absetzbaren Feststoffe lässt sich in der Grafik nicht erkennen. Bei beiden Koagulantien konnten niedrige Werte < 5 mg/L für die absetzbaren Feststoffe im Ablauf der Reinigungsstufe erreicht werden. Man erkennt ab dem 420. Versuchstag eine deutliche Verbesserung bei den Werten im Umlaufwasser und



den Schwankungen, denen diese Werte unterworfen waren. Diese Optimierung konnte allerdings auf verfahrenstechnische Veränderungen in der Wasseraufbereitung zurückgeführt werden und wurde nicht in Zusammenhang mit der Dosierung der Aluminiumsalzlösung gebracht.

#### **4.3 Mikrobiologische Analysen der Betriebsuntersuchungen**

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Anwesenheit von Mikroorganismen und einem durch sie verursachten mikrobiellen Nitratabbau. Zum Nachweis von Mikroorganismen wurden deshalb in allen Betriebsuntersuchungen Analysen zur mikrobiologischen Beschaffenheit und Zusammensetzung von Biofilm- und Wasserproben durchgeführt. Durch die Bestimmung der Gesamtzellzahl konnte ein quantitativer Nachweis von Mikroorganismen in den entnommenen Proben nach Anfärbung mit einem DNA-spezifischen Farbstoff (DAPI) und anschließendem Auszählen der Zellen unter dem Epifluoreszenzmikroskop erbracht werden. Die Bestimmung der Koloniezahl wurde als zusätzliche Kultivierungsmethode mit dem Ziel eingesetzt, die Zellausbeute in Abhängigkeit von zwei Nährmedien mit unterschiedlichem Nährstoffangebot zu untersuchen.

Da in den Betriebsuntersuchungen ein möglicher mikrobieller Nitratabbau das zentrale Thema dieser Arbeit ist, wurde eine MPN-Bestimmung speziell für nitratreduzierende Bakterien durchgeführt. Auf diese Weise konnte eine quantitative Aussage über die Mikroorganismen getroffen werden, die in der Lage sind, Nitrat als Nährstoff zu verwerten. Durch diese Untersuchungen könnte die Frage geklärt werden, ob der mikrobielle Abbau bevorzugt im Biofilm oder in der Wasserphase stattfindet.

#### **4.3.1 Charakterisierung von Biofilmproben**

Während der Betriebsuntersuchungen in den vier Betrieben wurden Biofilmproben vor und nach der Anwendung von ANS entnommen. Dabei wurden während einer betreffenden Betriebsuntersuchung die zu untersuchenden Biofilme immer an der gleichen Stelle abgeschabt. Der Biofilm aus der Papierfabrik 1 wurde am Überlaufkasten der Druckentspannungsflotation entnommen und im Fall der Papierfabrik 2 wurde der Biofilm von der Wand der Siebwasserinne gewonnen. Bei dem Recyclingunternehmen wurde der Biofilm direkt von der Wand der Druckentspannungsflotation abgeschabt. Im letzten untersuchten Industriebetrieb, dem metallverarbeitenden Betrieb, wurde der Biofilm von der Wand eines Schlammbehälters entnommen. Bei allen Probenahmestellen handelte es sich um offene, drucklose Systeme, die stets von Wasser benetzt waren und durchflossen wurden.

Auffällig war bei der Biofilmprobe aus dem metallverarbeitenden Betrieb die schwarze Farbe des gewonnenen Biofilms. In den drei anderen Betrieben wurde jeweils ein grauer Biofilm von den jeweiligen Oberflächen gewonnen. Alle Biofilme wiesen eine schleimige Konsistenz auf.

##### **4.3.1.1 Trockenrückstand und Glühverlust von Biofilmproben**

In den vier untersuchten Industriebetrieben wurden Biofilmproben vor und nach der Anwendung von ANS entnommen um mögliche Veränderungen nach der Zugabe beobachten zu können. Bei jeder Biofilmanalyse wurden zunächst der Trockenrückstand und der Glühverlust bestimmt, um zum einen mikrobiologische Analysenergebnisse darauf beziehen zu können und um zum anderen erste Aussagen über die Zusammensetzung des Biofilms machen zu können.

Eine Übersicht der Analysen des Trockenrückstandes und des Glühverlustes von den untersuchten Biofilmproben aus den Industriebetrieben ist in Abbildung 4.12 wiedergegeben. Die Differenz zwischen 100 % und dem Trockenrückstand entspricht dem Wassergehalt der Biofilmproben. Bei den Betriebsuntersuchungen in der Papierfabrik 1, der Papierfabrik 2 und dem Recyclingbetrieb wurde jeweils eine Probenahme vor der Dosierung von ANS durchgeführt. Alle weiteren untersuchten Proben beziehen sich auf die Verwendung von ANS als Koagulant im Wasserkreislaufsystem.

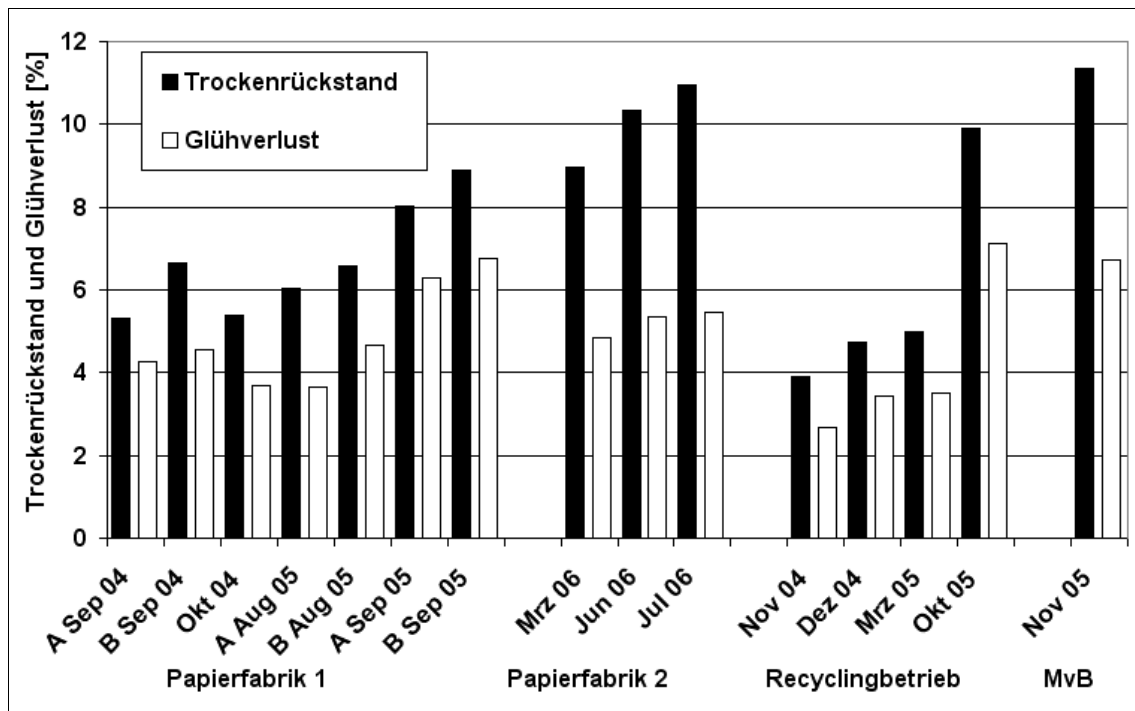


Abbildung 4.12: Trockenrückstand und Glühverlust von Biofilmproben aus vier unterschiedlichen Betrieben, dargestellt als prozentualen Anteile vom Feuchtgewicht. Jeder Balken entspricht einer unabhängigen Probe. MvB, metallverarbeitender Betrieb.

Die in dieser Arbeit untersuchten Biofilme aus vier Industriebetrieben wiesen einen Trockenrückstand von 4 – 12 % auf, dies entspricht einem Wassergehalt von mindestens 88 % und maximal 96 % Wasser. Der Glühverlust bzw. der organische Anteil der Biofilmproben, betrug zwischen 2 % und 7 % des Feuchtgewichtes und lag im Mittel bei ca. vier Gewichtsprozenten.

Anhand der durchgeführten Analysen lässt sich eine tendenzielle Zunahme des Trockenrückstandes und des Glühverlustes für die jeweiligen Biofilmproben aus den Industriebetrieben mit der Zeit erkennen. Die tendenzielle Zunahme scheint beim Trockenrückstand ausgeprägter zu sein, als dies beim Glühverlust der Fall ist.

Betrachtet man das Verhältnis von anorganischem zu organischem Anteil innerhalb des Trockenrückstandes, so erhält man eine weitere Information über die Zusammensetzung des Biofilms (Abbildung 4.13).

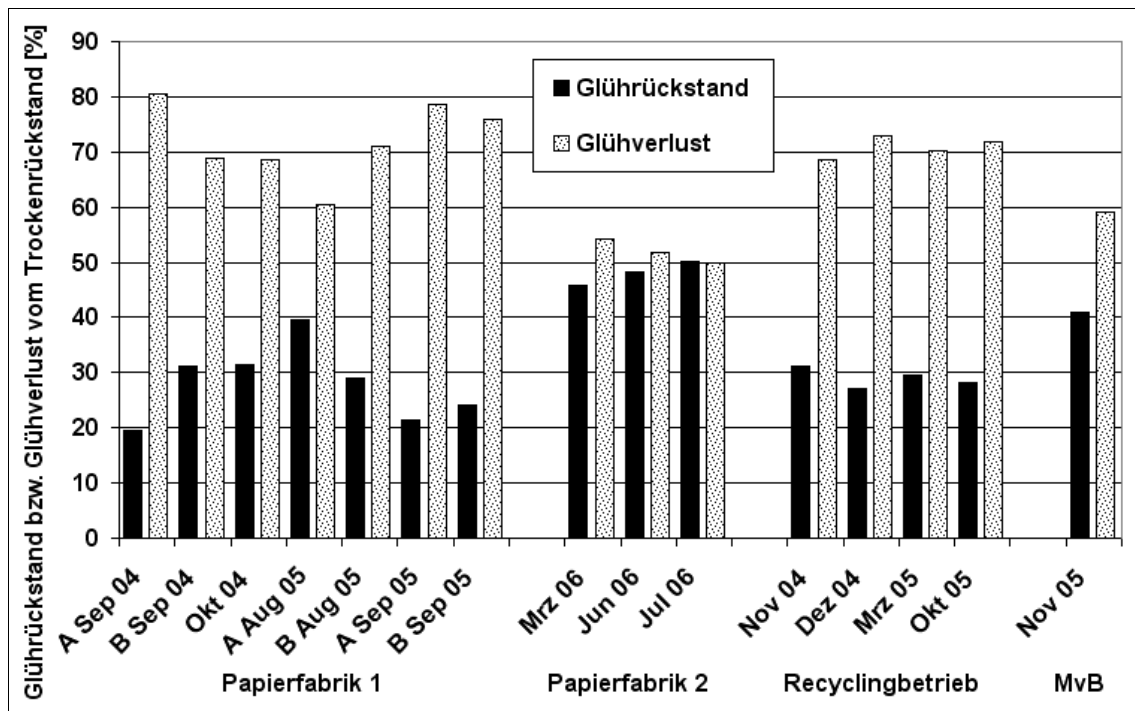


Abbildung 4.13: Glührückstand bzw. Glühverlust in Prozent vom Trockenrückstand der Biofilmpuben aus den vier Betriebsuntersuchungen. Jeder Balken entspricht einer unabhängigen Probe. MvB, metallverarbeitender Betrieb.

Für die vier Biofilme aus den Industriebetrieben ergaben sich unterschiedliche Anteile von Glührückstand und Glühverlust am Trockenrückstand. So war im Fall der Papierfabrik 1 und des Recyclingbetriebes überwiegend ein hoher Glühverlust von ca. 70% – 80 % im Trockenrückstand des Biofilms enthalten, während der anorganische Anteil vom Trockenrückstand (Glührückstand) dementsprechend niedrig bei nur ca. 20% – 30% lag. Bei der Papierfabrik 2 war das Verhältnis zwischen Glühverlust und Glührückstand ungefähr gleich mit jeweils 50 % Anteil. Beim metallverarbeitenden Betrieb wurde ein Verhältnis von 60 % Glühverlust zu 40 % Glührückstand im Biofilm festgestellt.

Nachdem die Biofilmpuben auf Trockenmasse und Glühverlust untersucht worden sind, können die mikrobiologischen Analysenergebnisse zum einen auf das Feuchtgewicht des Biofilms bezogen werden, um es mit Ergebnissen aus Wasseranalysen vergleichen zu können. Zum anderen können die mikrobiologischen Analysenergebnisse auch auf den Glühverlust bezogen werden, dies entspräche einem Bezug auf den organischen Anteil des Biofilms.

#### **4.3.1.2 Untersuchungen zur Dispergierung von Biofilmproben**

Um Mikroorganismen in den Biofilmproben aus den Betriebsuntersuchungen quantifizieren zu können, mussten die Biofilmproben zuerst homogen suspendiert werden, um die Zellen zu vereinzeln. Drei verschiedene mechanische Dispergiermethoden wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf ihre Eignung hin überprüft.

Als eine Methode zur Dispergierung wurden die Proben 1:10 mit partikelfreiem deionisiertem Wasser verdünnt und auf einem Reagenzglasschüttler dispergiert (Sharpe und Kilsby, 1970). Hierbei konnte nach zwei Minuten auf dem Reagenzglasschüttler visuell keine wesentliche Dispergierung beobachtet werden, da größere Agglomerate des Biofilms erhalten blieben. Dieses Ergebnis blieb auch nach längerer Dauer der Dispergierung unverändert. Aus diesem Grund wurde die Dispergierung mit dem Reagenzglasschüttler nicht weiter verfolgt, denn die in den Agglomeraten enthaltenen Zellen konnten mit dieser Methode nicht ausreichend dispergiert werden.

Als zweite Methode zur Zelldispergierung kam der so genannte „Stomacher“ (Walkgerät) zum Einsatz (Sharpe und Jackson, 1972; Gagnona und Slawson, 1999). Eine Biofilmprobe von 20 g Feuchtgewicht wurde dabei mit partikelfreiem deionisiertem Wasser auf 200 mL aufgefüllt und in einen sterilen Plastikbeutel gefüllt, der speziell für den Stomacher produziert wird. Danach wurde die Probe entweder 10 oder 20 Minuten im Stomacher bei 230 U/min durchgewalkt bzw. dispergiert.

Die dritte Methode zur Dispergierung von Biofilmproben wurde mit einem Hochgeschwindigkeitsrührer des Typs Ultra-Turrax durchgeführt (Scheen, 2003). Dabei wurden zwei unterschiedliche Rührzeiten von 30 s und 60 s und zwei unterschiedliche Drehzahlen (11.000 U/min bzw. 22.000 U/min) untersucht. Hierbei wurden 5 g Biofilm mit partikelfreiem deionisiertem Wasser auf 50 mL aufgefüllt und in ein hohes 200 mL Becherglas überführt. Das Becherglas wurde dann mit einer Aluminiumfolie versiegelt, die kurz vor der Dispergierung mit dem Ultra-Turrax durchstoßen wurde. Aufgrund der kurzen Behandlungsdauer von 30 s bzw. 60 s war eine Kühlung des Becherglases nicht erforderlich.

Die Eignung der Methoden zur Dispergierung wurde zum einen anhand der Gesamtzellzahlbestimmung und zum anderen anhand der Koloniezahl-Bestimmung bewertet. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl ist eine mikroskopische Untersuchung der Zellausbeute nach Anfärbung mit einem DNA-spezifischen Farbstoff (DAPI) und anschließend Auszählen der Zellen unter dem Mikroskop (Hobbie et al., 1977;

Saby et al., 1997; van Ommen Kloeke und Geesey, 1999). Die Bestimmung der Koloniezahl hingegen stellt eine Kultivierungsmethode dar, um die Zellausbeute in Abhängigkeit von zwei unterschiedlichen Nährmedien, nährstoffarm (R2A-Agar) und nährstoffreich (CASO-Agar), zu untersuchen. Die Bebrütung der Agar-Platten erfolgte immer aerob für 7 Tage bei 40 °C (Reasoner und Geldreich, 1984).

Die orientierenden Versuche zur Dispergierung von Biofilmpollen wurden zunächst an Biofilmen aus der Papierfabrik 1 durchgeführt. Für die Gesamtzellzahl konnten bei Einsatz beider Dispergier-Methoden, sowohl mit dem Ultra-Turrax als auch mit dem Stomacher annähernd gleiche Gesamtzellzahlen ermittelt werden (Abbildung 4.14).

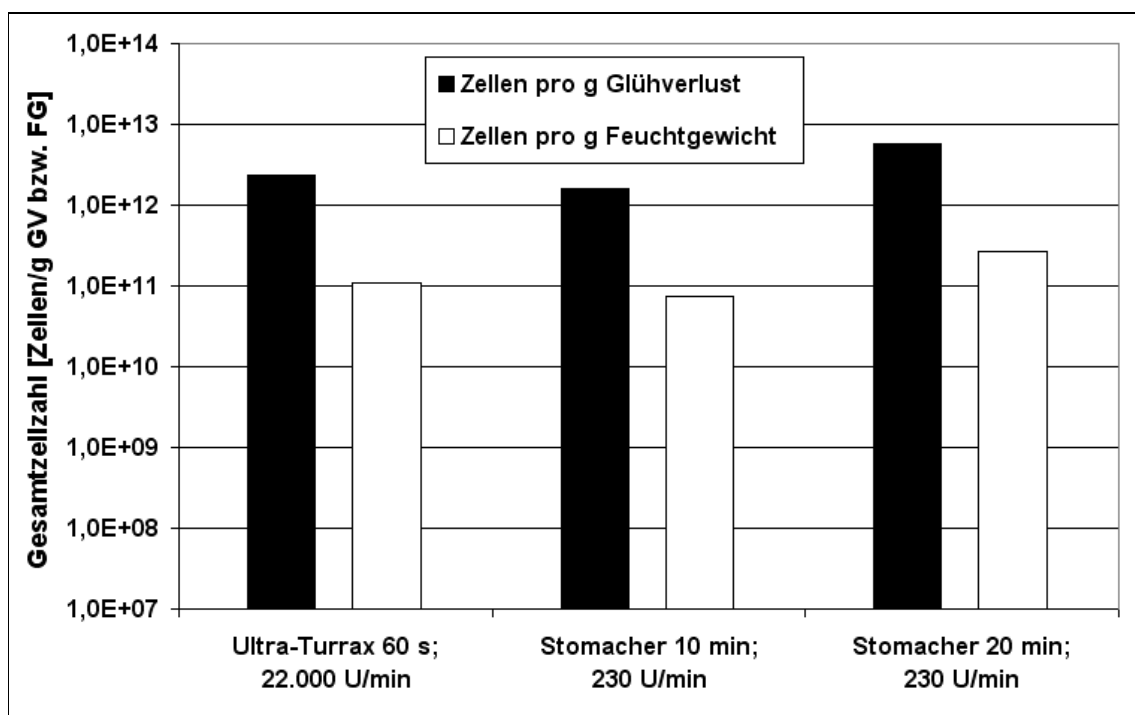


Abbildung 4.14: Ausbeute der Gesamtzellzahl einer Biofilmprobe aus der Papierfabrik 1 in Abhängigkeit von der Dispergiermethode. Die Dispergierung erfolgte mit einem Ultra-Turrax und einem Stomacher.

Die Ergebnisse für die Koloniezahl-Bestimmung mit nährstoffarmem R2A-Agar und nährstoffreichem CASO-Agar sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Hier wurde die gleiche Biofilmprobe aus der Papierfabrik 1 verwendet, die auch bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl verwendet worden war.

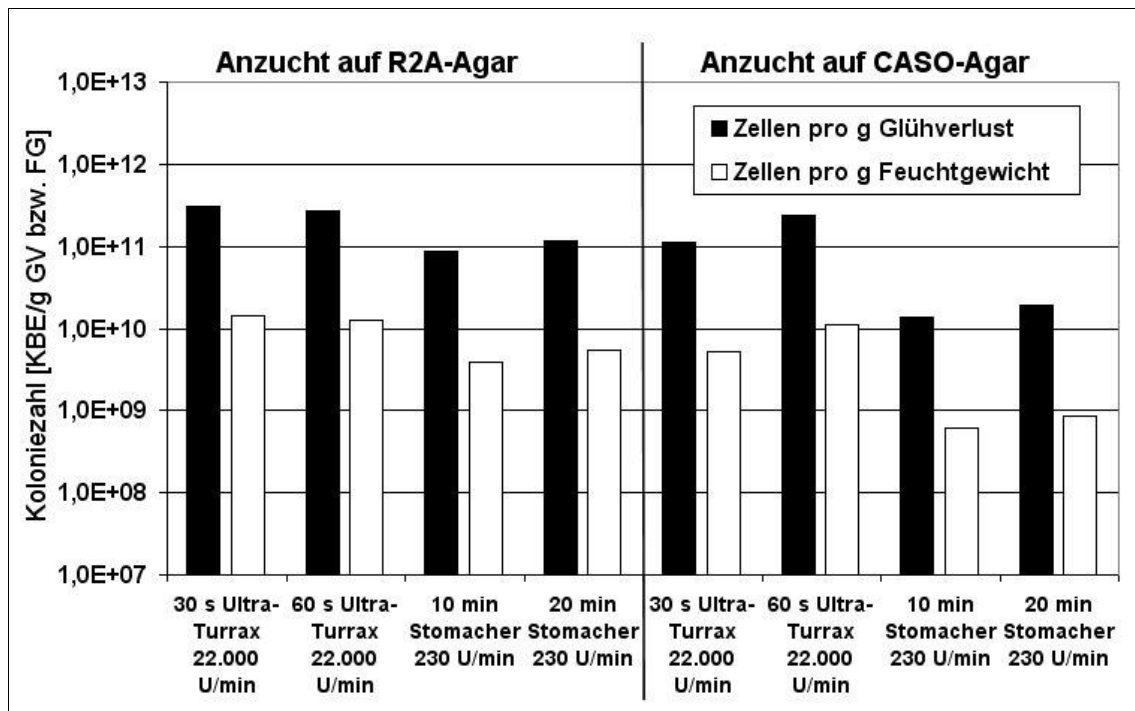


Abbildung 4.15: Ausbeute der Koloniezahl einer Biofilmprobe aus der Papierfabrik 1 auf R2A- und CASO-Agar in Abhängigkeit von der Dispergiermethode. Die Dispergierung erfolgte mit einem Ultra-Turrax und einem Stomacher. Die Bebrütung der Platten erfolgte bei 40 °C für 7 d.

Die zwei ausgewählten Behandlungszeiträume für die Zelldispergierung hatten beim Stomacher, genau wie beim Ultra-Turrax, keine Auswirkung auf die Zellausbeute, da die Zahl der koloniebildenden Einheiten nach 30 s und nach 60 s Dispergier-Dauer beim Ultra-Turrax gleich groß waren. Beim Stomacher waren die Zellausbeuten nach 10 min und 20 min Walkzeit ebenfalls gleich groß. Es zeigte sich jedoch ein Unterschied in der Zellausbeute von ungefähr einer Log-Stufe zugunsten der Dispergierung mit dem Ultra-Turrax im Vergleich zum Stomacher.

Da die Methode zur Dispergierung des Biofilms mit Hilfe des Ultra-Turrax etwas höhere Zellausbeuten bei der Koloniezahl-Bestimmung liefern konnte, wurde im Weiteren nur noch die Dispergierung mit dem Ultra-Turrax untersucht.

Da bei der Dispergierung mit dem Ultra-Turrax die Behandlungsdauer und die Drehzahl frei gewählt werden können, wurden diese beiden Parameter im Hinblick auf die Zellausbeute bei der Dispergierung mit dem Ultra-Turrax für die Gesamtzellzahl (Abbildung 4.16) und die Koloniezahl (Abbildung 4.17) näher untersucht. Es wurde bei 11.000 U/min und 22.000 U/min für 30 s bzw. 60 s dispergiert.

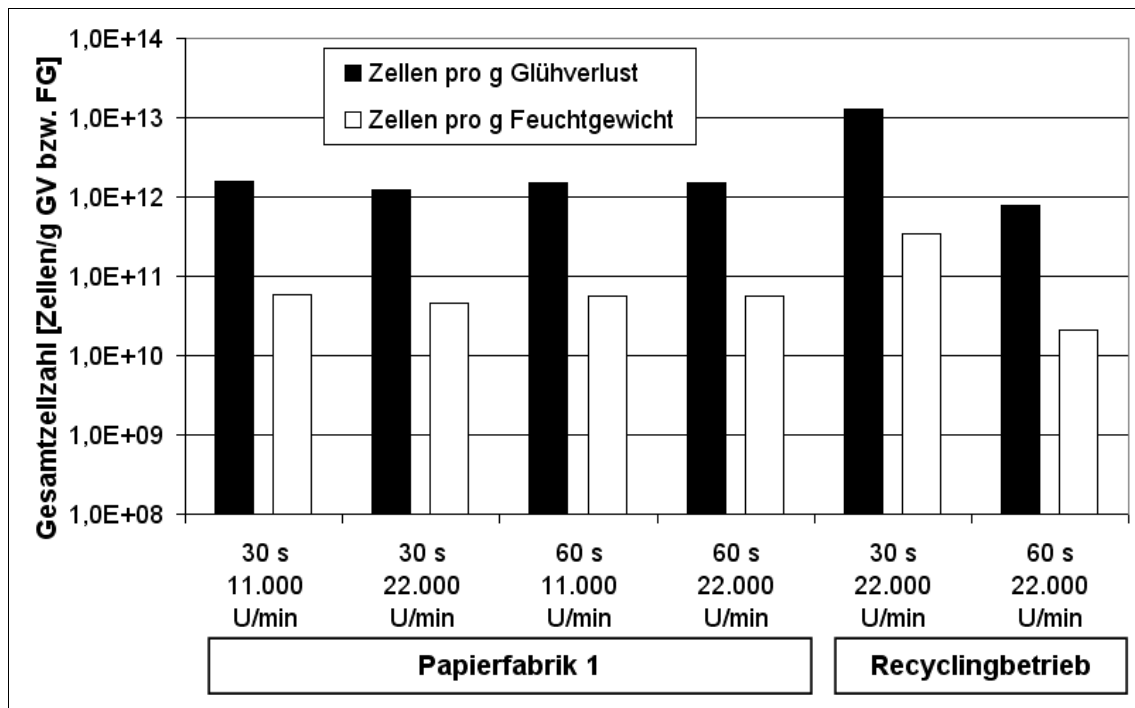


Abbildung 4.16: Ausbeute der Gesamtzellzahl von Biofilmproben aus der Papierfabrik 1 und dem Recyclingbetrieb im Bezug auf den Glühverlust (GV) und das Feuchtgewicht (FG) in Abhängigkeit von der Dispergiermethode. Die Dispergierung erfolgte mit einem Ultra-Turrax bei unterschiedlichen Drehzahlen und Behandlungsdauern.

Die Dispergierung der Biofilmprobe aus der Papierfabrik 1 mit dem Ultra-Turrax zeigte sowohl bei 11.000 U/min als auch bei 22.000 U/min ähnliche Werte für die Gesamtzellzahl in Höhe von  $2 \times 10^{12}$  Zellen/g Glühverlust des Biofilms. Gleiches gilt für die unterschiedliche Behandlungsdauer in Höhe von 30 s bzw. 60 s bei 11.000 U/min bzw. 22.000 U/min. Auch hier war kein Unterschied in der bestimmten Gesamtzellzahl erkennbar. Im Fall der Biofilmprobe aus dem Recyclingbetrieb konnten innerhalb von 30 s um eine Logstufe mehr Zellen aus dem Biofilm dispergiert werden, als dies nach 60 s der Fall war.



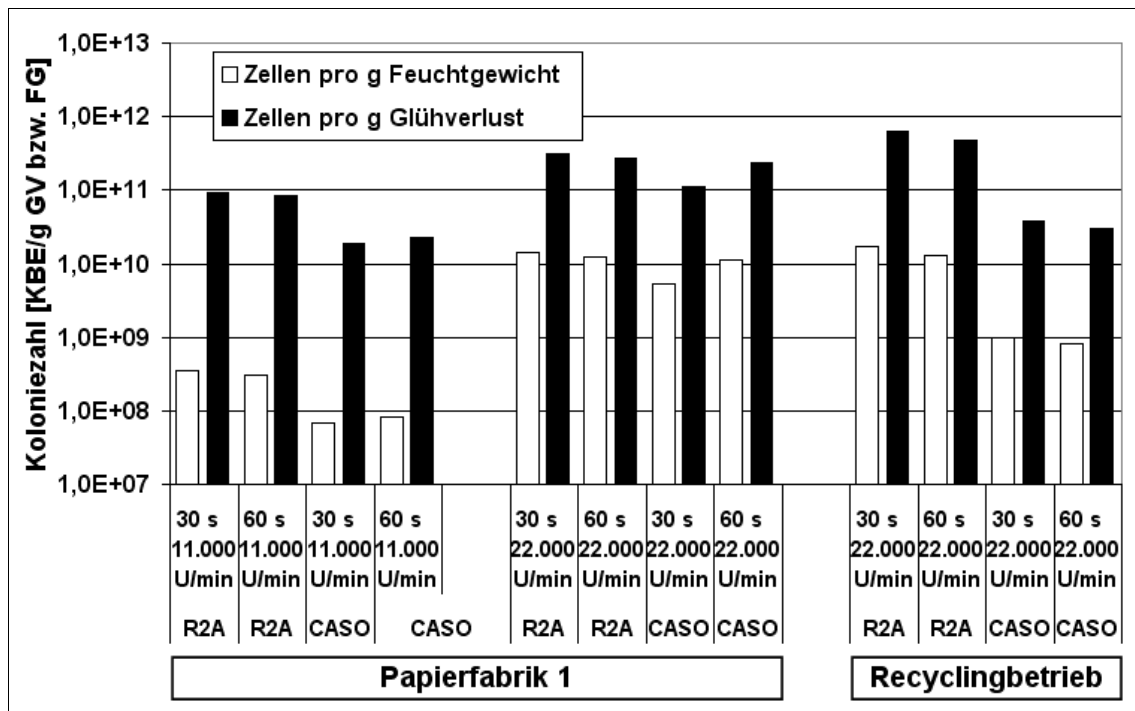


Abbildung 4.17: Ausbeute der Koloniezahl einer Biofilmprobe aus der Papierfabrik 1 und dem Recyclingbetrieb auf R2A- und CASO-Agar in Abhängigkeit von der Dispergiermethode. Die Dispergierung wurde mit einem Ultra-Turrax bei unterschiedlichen Drehzahlen und Behandlungsdauern durchgeführt. Die Bebrütung der Agarplatten erfolgte bei 40 °C für 7 d.

Bei der Koloniezahlbestimmung der unterschiedlich dispergierten Biofilmpuben konnten im Falle der Papierfabrik 1 bei erhöhter Drehzahl (22.000 U/min) etwas höhere Ausbeuten mit dem Ultra-Turrax bestimmt werden im Vergleich zur niedrigen Drehzahl von 11.000 U/min (Abbildung 4.17). Die längere Behandlungsdauer von 60 s ergab unabhängig von der Herkunft der Probe, im Vergleich zur Dispergierung der Biofilmpuben für 30 s keine Erhöhung bei der Koloniezahl. Sowohl auf R2A-Agar als auch auf CASO-Agar wurden vergleichbare koloniebildenden Einheiten pro Gramm Glühverlust Biofilm nachgewiesen. Aufgrund dieser beiden Beobachtungen wurde für alle weiteren Biofilmpuben die Dispergierung mit dem Ultra-Turrax für 30 s bei 22.000 U/min festgelegt.

Die Ausbeute bei der Koloniezahl-Bestimmung schien auch durch die Auswahl des Nährmediums beeinflusst zu werden. Proben aus der Papierfabrik 1 und aus dem Recyclingbetrieb wurden jeweils auf R2A-Agar und auf CASO-Agar ausplattiert und nach einer Bebrütung von 7 Tagen bei 40 °C die Koloniezahl bestimmt (Abbildung 4.18).

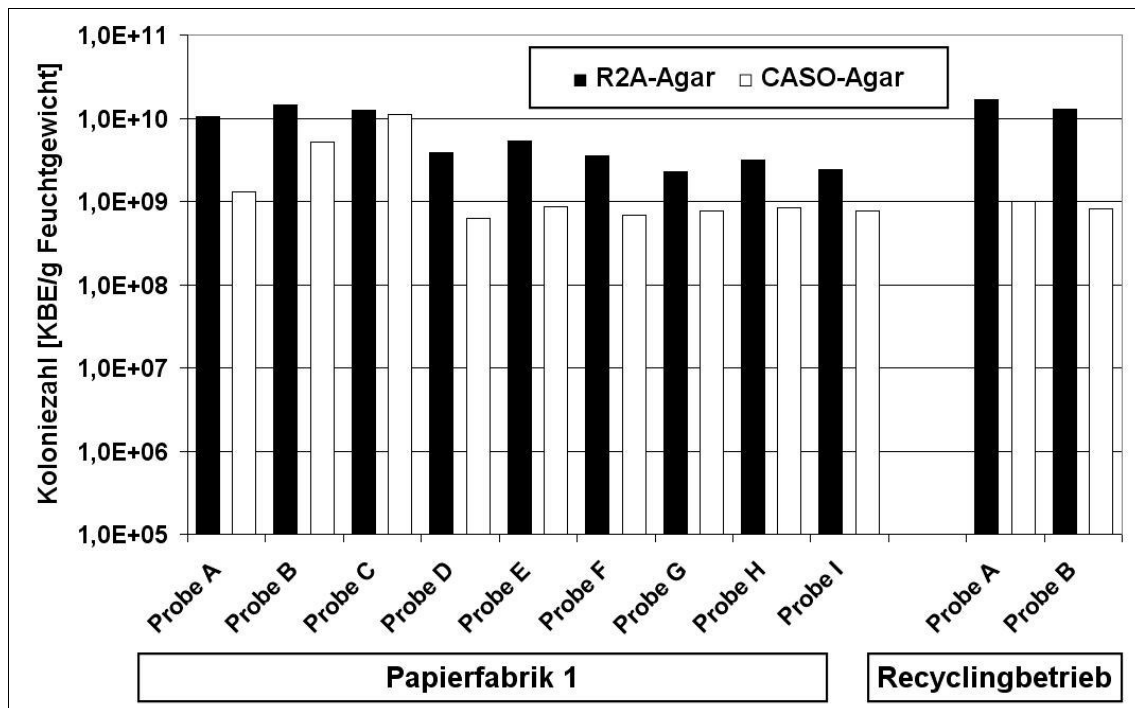


Abbildung 4.18: Koloniezahl-Ausbeute identischer Biofilmproben aus der Papierfabrik 1 und dem Recyclingbetrieb nach unterschiedlicher Dispergierung. Die Anzucht der Kolonien erfolgte mit R2A- und CASO-Agar. Bebrütet wurden die Platten bei 40 °C für 7 d.

Vergleicht man die identischen Biofilmproben, so konnten auf dem nährstoffarmen R2A-Agar stets mehr Kolonien gezählt werden, als dies auf dem nährstoffreichen CASO-Agar der Fall war. Dies bestätigte sich sowohl bei den Untersuchungen der Biofilme aus der Papierfabrik 1 als auch bei den Biofilmproben aus dem Recyclingbetrieb. Die Anzahl koloniebildender Einheiten lag als Mittelwert über alle Proben aus der Papierfabrik 1 ermittelt mit R2A-Agar bei  $6 \times 10^9$  KBE/g Feuchtgewicht bzw.  $2 \times 10^{11}$  KBE/g Glühverlust vom Biofilm und auf CASO-Agar nur bei  $3 \times 10^9$  KBE/g Feuchtgewicht bzw.  $6 \times 10^{10}$  KBE/g Glühverlust vom Biofilm. Die Mittelwerte koloniebildender Einheiten aus dem Recyclingbetrieb zeigten einen noch deutlicheren Unterschied im Bezug auf die beiden verwendeten Nährmedien. Auf R2A-Agar wurden im Mittel  $2 \times 10^{10}$  KBE/g Feuchtgewicht bzw.  $6 \times 10^{11}$  KBE/g Glühverlust vom Biofilm bestimmt. Auf CASO-Agar konnten nur  $9 \times 10^8$  KBE/g Feuchtgewicht bzw.  $3 \times 10^{10}$  KBE/g Glühverlust vom Biofilm nachgewiesen werden.

Fasst man alle Analysenergebnisse aus Abbildung 4.18 zusammen, so ergibt sich ein Mittelwert für die beiden untersuchten Betriebe auf R2A-Agar von  $8 \times 10^9$  KBE/g Feuchtgewicht bzw.  $2 \times 10^{11}$  KBE/g Glühverlust Biofilm und auf CASO-Agar von  $2 \times 10^9$  KBE/g Feuchtgewicht bzw.  $5 \times 10^{10}$  KBE/g Glühverlust Biofilm. Dieses Ergebnis weist auf eher an nährstoffarme Bedingungen angepasste Mikroorganismen in den Biofilmen aus der Papierfabrik 1 und dem Recyclingbetrieb

hin, da das R2A-Medium zum Nachweis von Wasserbakterien in nährstoffarmer Umgebung entwickelt worden war (Reasoner und Geldreich, 1984).

Aufgrund der erhöhten Ausbeute an Kolonien auf R2A-Agar, wurden alle weiteren Koloniezahl-Bestimmungen von Biofilm- und Wasserproben aus den Betriebsuntersuchungen nur noch auf R2A-Agar durchgeführt.

#### **4.3.2 Gesamtzellzahl- und Koloniezahl-Bestimmung von Biofilmproben**

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Anwesenheit von Mikroorganismen und einem durch sie verursachten mikrobiellen Nitratabbau. Zum Nachweis von Mikroorganismen wurden deshalb in allen Betriebsuntersuchungen Biofilm- und Wasserproben entnommen und auf die Gesamtzellzahl und Koloniezahl untersucht. Durch diese beiden Analysemethoden wurden Aussagen über die Anzahl von Bakterien und den Anteil kultivierbarer Organismen in der jeweiligen Biofilmprobe möglich.

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl als mikroskopische Untersuchung erfasst die in einer Probe vorhandenen Mikroorganismen, nach Anfärbung mit einem DNA-spezifischen Farbstoff (DAPI) und anschließendem Auszählen der Zellen unter dem Epifluoreszenzmikroskop (Hobbie et al., 1977; Saby et al., 1997; van Ommen Kloeke und Geesey, 1999). Bei dieser Methode wird allerdings nicht berücksichtigt, ob die Mikroorganismen noch stoffwechselaktiv sind oder nicht. Die Bestimmung der Koloniezahl wurde als zusätzliche kulturelle Methode zur Quantifizierung eingesetzt, um eine Aussage über die Zahl der vermehrungsfähigen Mikroorganismen machen zu können (Reasoner und Geldreich, 1984). Die Anzucht der Bakterien erfolgte mit R2A-Agar für 7 Tage bei 40 °C, weil diese Temperatur der Wasserkreislauf-temperatur in den Industriebetrieben entsprach.

Im Fall der Bestimmung der Gesamtzellzahl der Biofilmproben konnten nur die Ergebnisse aus den beiden Papierfabriken und dem Recyclingbetrieb miteinander verglichen werden (Abbildung 4.19). Bei der Analyse der Biofilmproben aus dem metallverarbeitenden Betrieb wurden wiederholt stark fluoreszierende Partikel beobachtet, die eine eindeutige Quantifizierung der Mikroorganismen unter dem Mikroskop verhinderten.

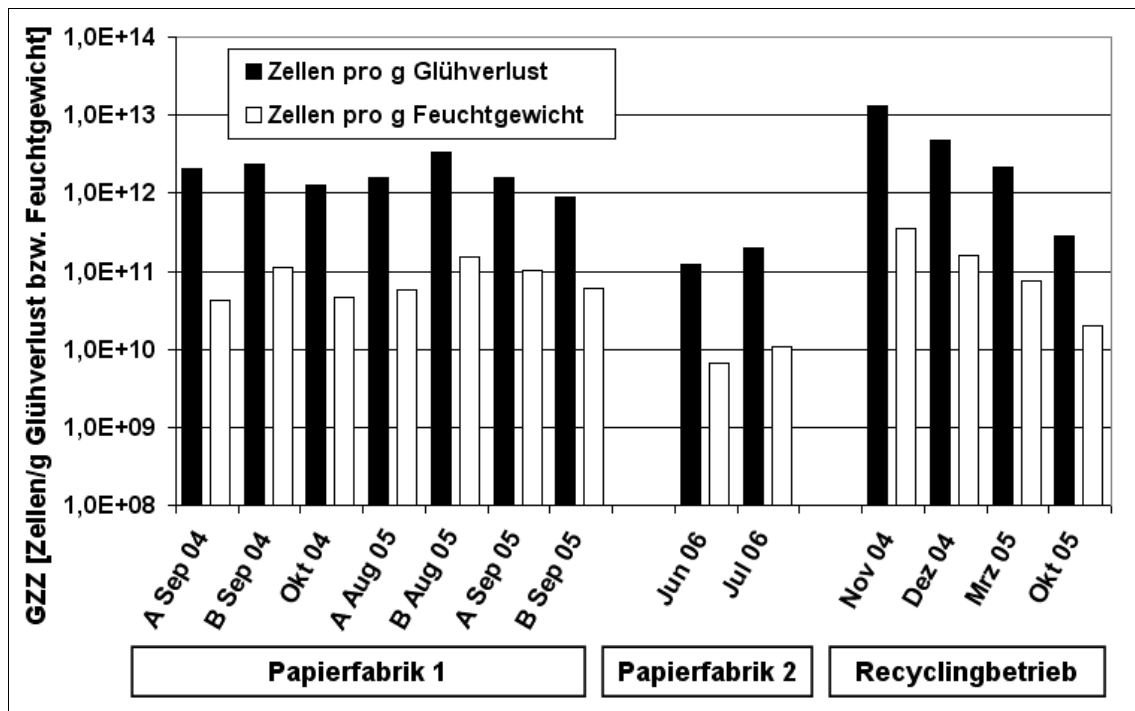


Abbildung 4.19: Gesamtzellzahl von Biofilmproben aus drei verschiedenen Betriebsuntersuchungen. In der Papierfabrik 1 und dem Recyclingbetrieb wurde eine Probenahme vor der Dosierung von ANS durchgeführt. Alle weiteren untersuchten Proben beziehen sich auf die Verwendung von ANS als Koagulant im Wasserkreislaufsystem.

In allen analysierten Biofilmproben aus drei verschiedenen Industriebetrieben konnten insgesamt  $10^{11}$  bis maximal  $10^{13}$  Zellen/g Glühverlust Biofilm bestimmt werden. Die ermittelten Gesamtzellzahlen für die Biofilme aus der Papierfabrik 1 lagen relativ konstant bei  $10^{12}$  Zellen/g Glühverlust. Insgesamt sieben Proben innerhalb eines Versuchszeitraumes von einem Jahr wiesen kaum Schwankungen auf. Bei der Papierfabrik 2 wurden zwei Analysen innerhalb von zwei Monaten durchgeführt. Hier lagen die Ergebnisse der Gesamtzellzahlbestimmung mit  $10^{11}$  Zellen/g Glühverlust um eine Log-Stufe niedriger als in der Papierfabrik 1. Die Analysen des Recyclingbetriebes mit vier Probenahmen innerhalb eines Jahres ergaben anfangs eine sehr hohe Gesamtzellzahl von über  $10^{13}$  Zellen/g Glühverlust. Im Verlauf der nächsten drei Probenahmen sanken die Gesamtzellzahlen von  $10^{13}$  bis auf  $3 \times 10^{11}$  Zellen/g Glühverlust Biofilm ab.

In ausgewählten Fällen wurde zusätzlich die Koloniezahl der entnommenen Biofilmproben bestimmt (Abbildung 4.20).

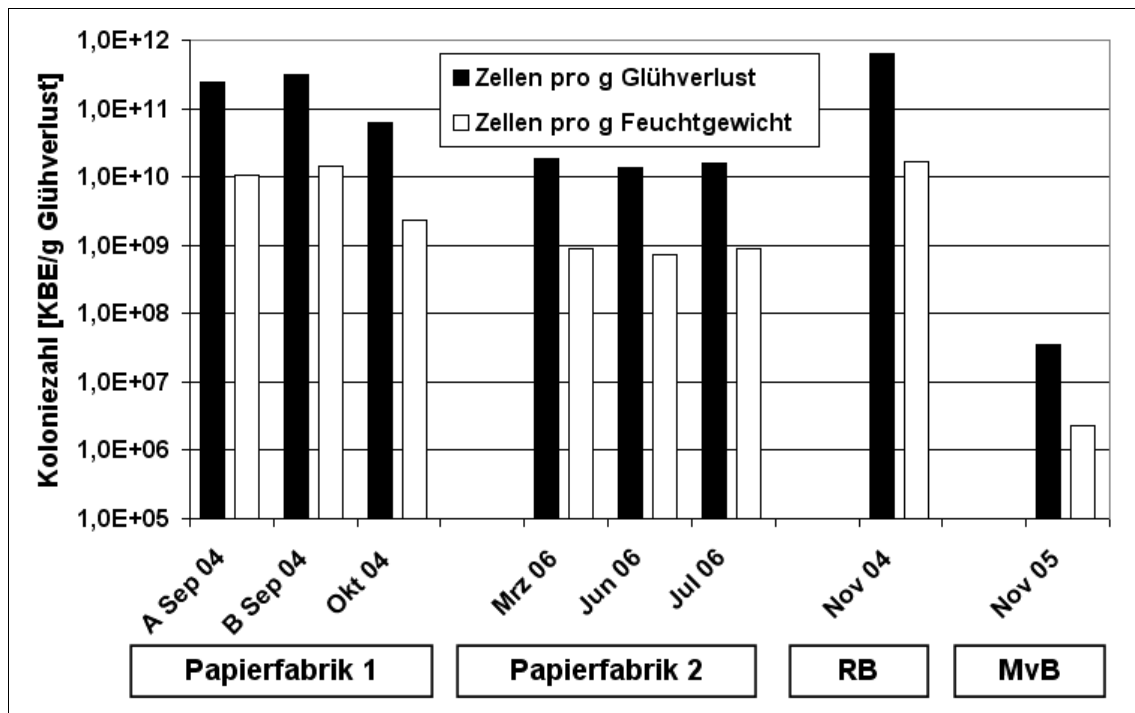


Abbildung 4.20: Koloniezahl von Biofilmpollen aus verschiedenen Betrieben. Die Anzucht erfolgte mit R2A-Agar für 7 Tage bei 40 °C. RB, Recyclingbetrieb; MvB, metallverarbeitender Betrieb. In den Papierfabriken 1 und 2, sowie dem RB wurde eine Probenahme vor der Dosierung von ANS durchgeführt. Alle weiteren Proben beziehen sich auf die Verwendung von ANS als Koagulant im Wasserkreislaufsystem.

Auffällig ist die deutlich niedrigere Koloniezahl im Falle des metallverarbeitenden Betriebes von  $3 \times 10^7$  KBE/g Glühverlust Biofilm im Vergleich zu den Koloniezahlen der drei übrigen Betriebe, die in einer Größenordnung von  $10^{10}$  bis  $10^{12}$  KBE/g Glühverlust liegen. In Biofilmpollen aus der Papierfabrik 1 konnten ca.  $10^{11}$  KBE/g Glühverlust bestimmt werden, während in der Papierfabrik 2 etwas niedrigere Koloniezahlen von ca.  $10^{10}$  KBE/g Glühverlust Biofilm ermittelt wurden. Genau wie zuvor bei der Gesamtzellzahlbestimmung wurden auch bei der Koloniezahlbestimmung die höchsten Werte in der Biofilmpollen aus dem Recyclingbetrieb mit  $6 \times 10^{11}$  KBE/g Glühverlust Biofilm ermittelt.

#### 4.3.3 Gesamtzellzahl- und Koloniezahl-Bestimmung von Wasserproben

Parallel zu den im vorherigen Kapitel behandelten Biofilmpollen, wurde in ausgewählten Fällen am Tag der Probenahme zeitgleich eine Wasserprobe im Industriebetrieb entnommen und analysiert. Im Recyclingbetrieb und im metallverarbeitenden Betrieb wurde zusätzlich zu der Probe aus dem Wasserkreislauf auch das eingesetzte Frischwasser des Betriebes auf die Gesamtzellzahl (Abbildung 4.21) und die Koloniezahl (Abbildung 4.22) untersucht.

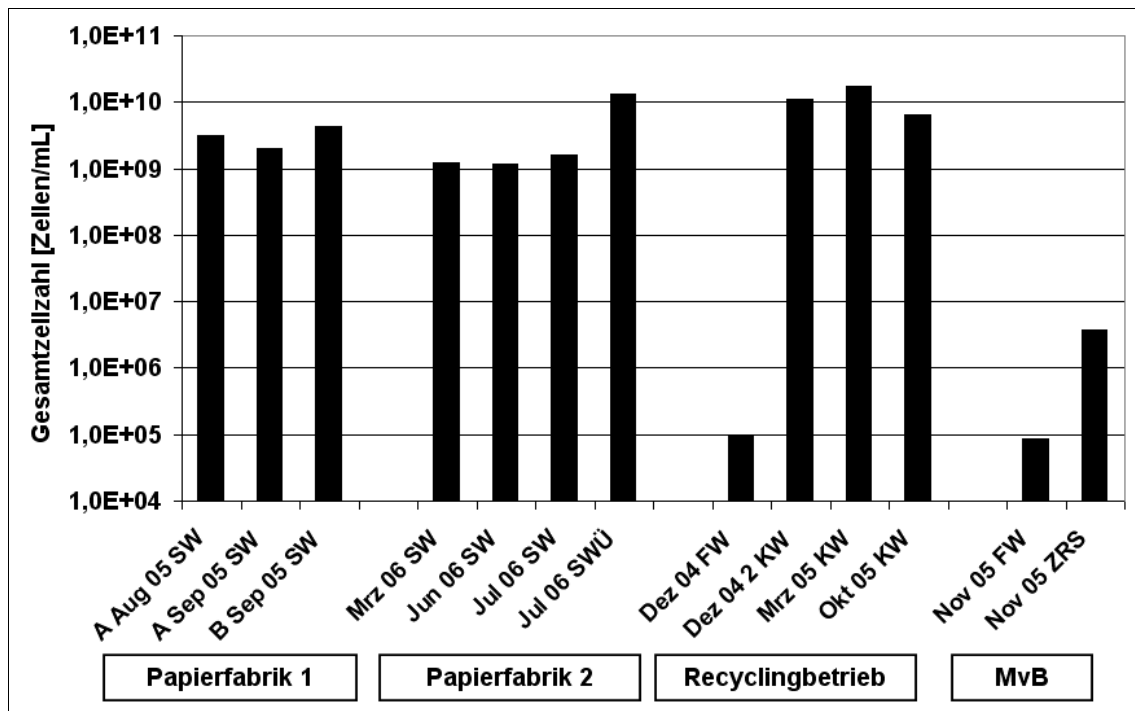


Abbildung 4.21: Gesamtzellzahl von Wasserproben aus verschiedenen Betriebsuntersuchungen. MvB, metallverarbeitender Betrieb; SW, Siebwasser; FW, Frischwasser; ZRS, Zulauf Reinigungsstufe; SWÜ, Siebwasser-Überstand. In der Papierfabrik 2 wurde eine Probenahme vor der Dosierung von ANS durchgeführt. Alle weiteren Proben beziehen sich auf die Verwendung von ANS als Koagulant im Wasserkreislaufsystem.

In den beiden Papierfabriken 1 und 2, sowie in dem Recyclingbetrieb wurden Gesamtzellzahlen im Kreislaufwasser zwischen  $10^9$  und  $10^{10}$  Zellen/mL nachgewiesen. Genau wie zuvor bei den Analysen der Biofilmpuben ergab die Analyse der Wasserprobe aus dem metallverarbeitenden Betrieb im Vergleich zu den übrigen drei Betrieben, bei der Gesamtzellzahl eine um mehr als drei Logstufen niedrigere Zellzahl.

Das aus der Frischwasseraufbereitung in zwei Betriebe eingespeiste Frischwasser wurde ebenfalls analysiert. Es ergaben sich sowohl für den Recyclingbetrieb wie auch für den metallverarbeitenden Betrieb ähnliche Werte in einer Größenordnung von  $10^5$  Zellen/mL Frischwasser.

Für ausgewählte Wasserproben aus der Papierfabrik 2 und dem metallverarbeitenden Betrieb wurden Untersuchungen der Koloniezahl mit R2A-Agar durchgeführt (Abbildung 4.22).

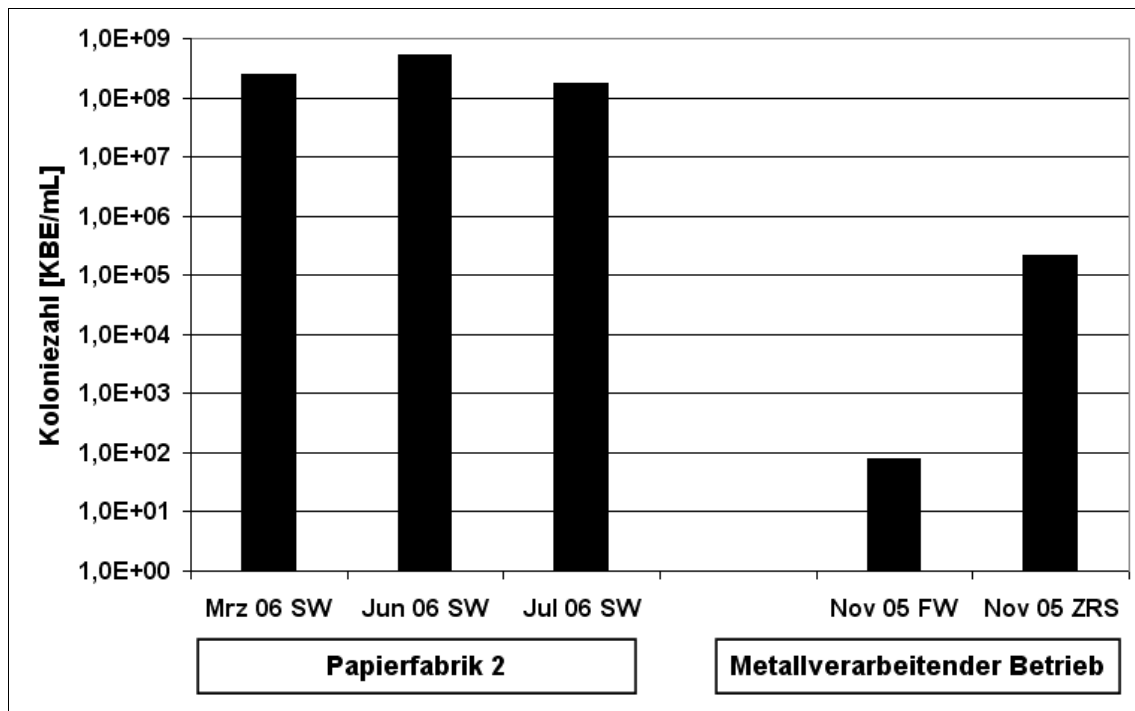


Abbildung 4.22: Koloniezahl von Wasserproben aus zwei verschiedenen Betriebsuntersuchungen. Die Bebrütung erfolgte mit R2A-Agar für 7 Tage bei 40 °C. SW, Siebwasser; FW, Frischwasser; ZRS, Zulauf Reinigungsstufe. In der Papierfabrik 2 wurde eine Probenahme vor der Dosierung von ANS durchgeführt. Alle weiteren Proben beziehen sich auf die Verwendung von ANS als Koagulant im Wasserkreislaufsystem.

Die Analyse der Frischwasserprobe aus dem metallverarbeitenden Betrieb ergab nur 80 KBE/mL, obwohl bei der Gesamtzellzahlbestimmung  $9 \times 10^4$  Zellen/mL ermittelt wurden. Beim Zulauf in die Reinigungsstufe des metallverarbeitenden Betriebes wurden  $2 \times 10^5$  KBE/mL im Vergleich zur Gesamtzellzahl von  $4 \times 10^6$  Zellen/mL bestimmt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es im Wasserkreislauf des metallverarbeitenden Betriebes zu einer Vermehrung der kultivierbaren Mikroorganismen gekommen ist, denn die Zahl der koloniebildenden Einheiten hatte sich um den Faktor 40.000 erhöht.

Bei der Untersuchung der Wasserproben aus der Papierfabrik 2 wurde bei allen drei Analysen, vor und nach der Umstellung auf ANS, eine Koloniezahl in der Größenordnung von  $10^8$  KBE/mL nachgewiesen.

#### 4.3.4 Nitratreduzierende Bakterien in Biofilm- und Wasserproben

Um nachzuweisen, dass eine mikrobielle Nitratreduktion durch die im Wasserkreislauf vorhandenen Mikroorganismen möglich ist und wo der mikrobielle Nitratabbau bevorzugt stattfindet, wurden die nitratreduzierenden Bakterien (NRB) in Biofilm- und Wasserproben mit Hilfe einer MPN-Methode (Kapitel 3.4.3) quantifiziert. Das MPN-Verfahren wurde mit einem Dreifach-Ansatz als Flüssigkeitsanreicherung in Nitratbouillon durchgeführt, um NRB in Biofilm- und Wasserproben aus den untersuchten Betrieben selektiv zu vermehren und quantifizieren zu können (Abbildung 4.23 und 4.24).

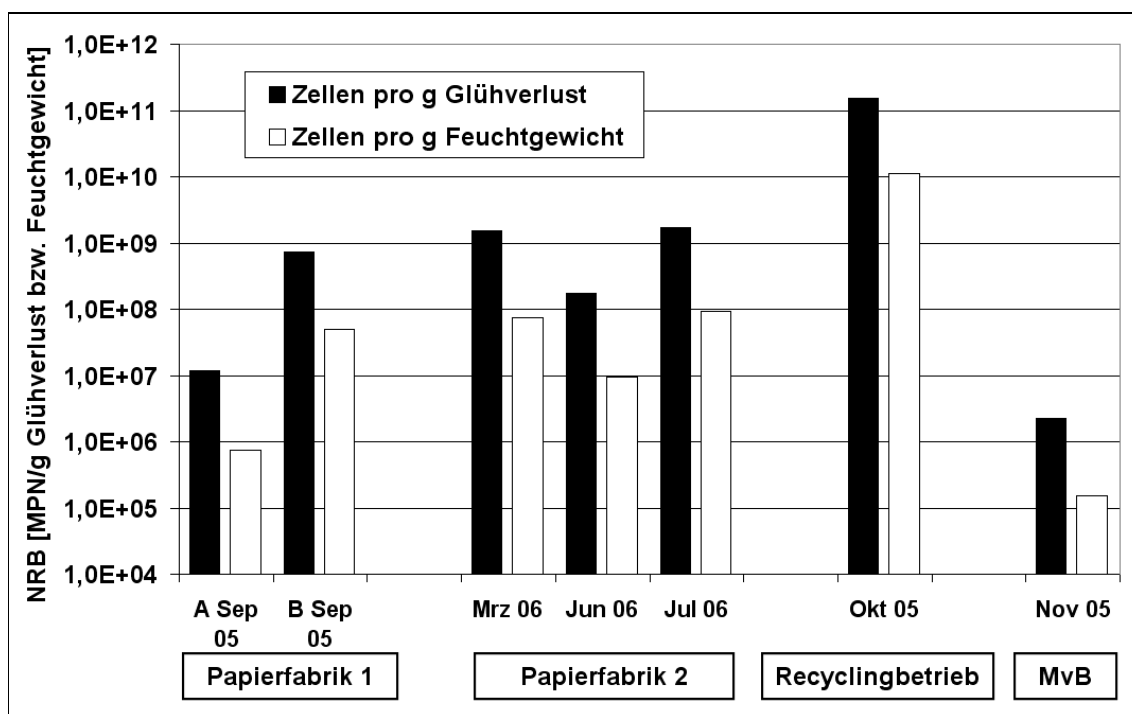


Abbildung 4.23: Nitratreduzierende Bakterien (NRB) in Biofilmproben aus den Betriebsuntersuchungen. MvB, metallverarbeitender Betrieb. In der Papierfabrik 2 wurde eine Probenahme vor der Dosierung von ANS durchgeführt. Alle weiteren Proben beziehen sich auf die Verwendung von ANS als Koagulant im Wasserkreislaufsystem.

In Biofilmen aus den beiden Papierfabriken konnten NRB-Konzentrationen zwischen  $10^7$  und  $10^9$  MPN/g Glühverlust nachgewiesen werden. Die höchsten Werte wurden im Falle des Recyclingbetriebes erhalten. Hier konnten in einem Fall  $10^{11}$  MPN/g Glühverlust Biofilm bestimmt werden. Im Biofilm aus dem metallverarbeitenden Betrieb wurden dagegen weniger Nitratreduzierer in einer Größenordnung von  $10^6$  MPN/g Glühverlust nachgewiesen.



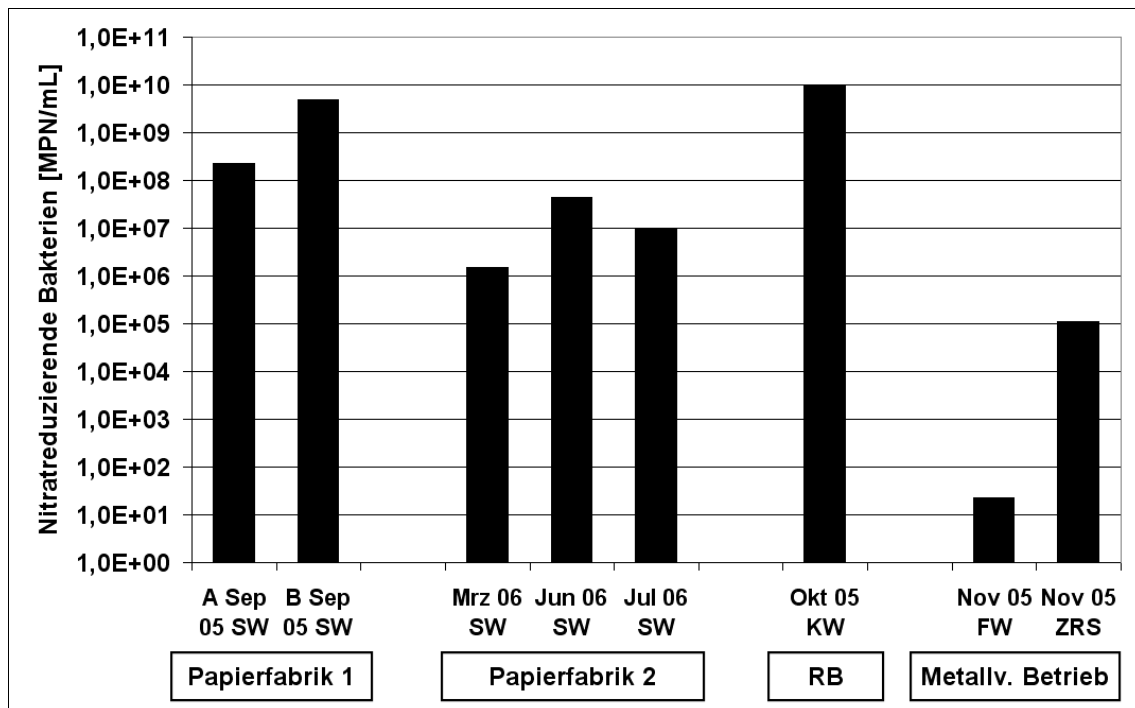


Abbildung 4.24: Nitratreduzierenden Bakterien in Wasserproben aus vier Betriebsuntersuchungen. RB, Recyclingbetrieb; SW, Siebwasser; FW, Frischwasser; ZRS, Zulauf Reinigungsstufe. In der Papierfabrik 2 wurde eine Probenahme vor der Dosierung von ANS durchgeführt. Alle weiteren Proben beziehen sich auf die Verwendung von ANS als Koagulant im Wasserkreislaufsystem.

Bei den Analysen der Wasserproben wurden genau wie bei den Biofilmpuben für den Recyclingbetrieb die höchsten Werte für NRB mit fast  $10^{10}$  MPN/mL ermittelt. In der Papierfabrik 1 wurden etwas niedrigere Werte für Nitratreduzierer von  $2 \times 10^8$  und  $5 \times 10^9$  MPN/mL gefunden. In den Biofilmpuben aus der Papierfabrik 2 wurden im Vergleich zur Papierfabrik 1 um zwei Logstufen niedrigere Konzentrationen NRB von  $2 \times 10^6$  bis  $4 \times 10^7$  MPN/mL bestimmt.

Die niedrigsten Werte für NRB in Wasserproben wurden im metallverarbeitenden Betrieb nachgewiesen. Im Frischwasser des Betriebes konnten nur 23 MPN/mL gefunden werden. In der Kreislaufwasserprobe des gleichen Betriebes wurden dagegen deutlich höhere NRB-Konzentrationen im Zulauf zur Reinigungsstufe von  $1 \times 10^5$  MPN/mL nachgewiesen.

### 4.3.5 Zusammenfassung der mikrobiologischen Analysen aus den Betriebsuntersuchungen

In den vorangegangenen Kapiteln wurde auf die mikrobiologischen Parameter Gesamtzellzahl (GZZ), Koloniezahl (KZ) und nitratreduzierende Bakterien (NRB) separat eingegangen. An dieser Stelle sind die erhaltenen Ergebnisse zueinander in Bezug gesetzt.

Beginnend mit den Biofilmpuben aus den vier verschiedenen Betriebsuntersuchungen sind die Ergebnisse für die drei Parameter Gesamtzellzahl, Nitratreduzierer und Koloniezahl veranschaulicht (Abbildung 4.25).

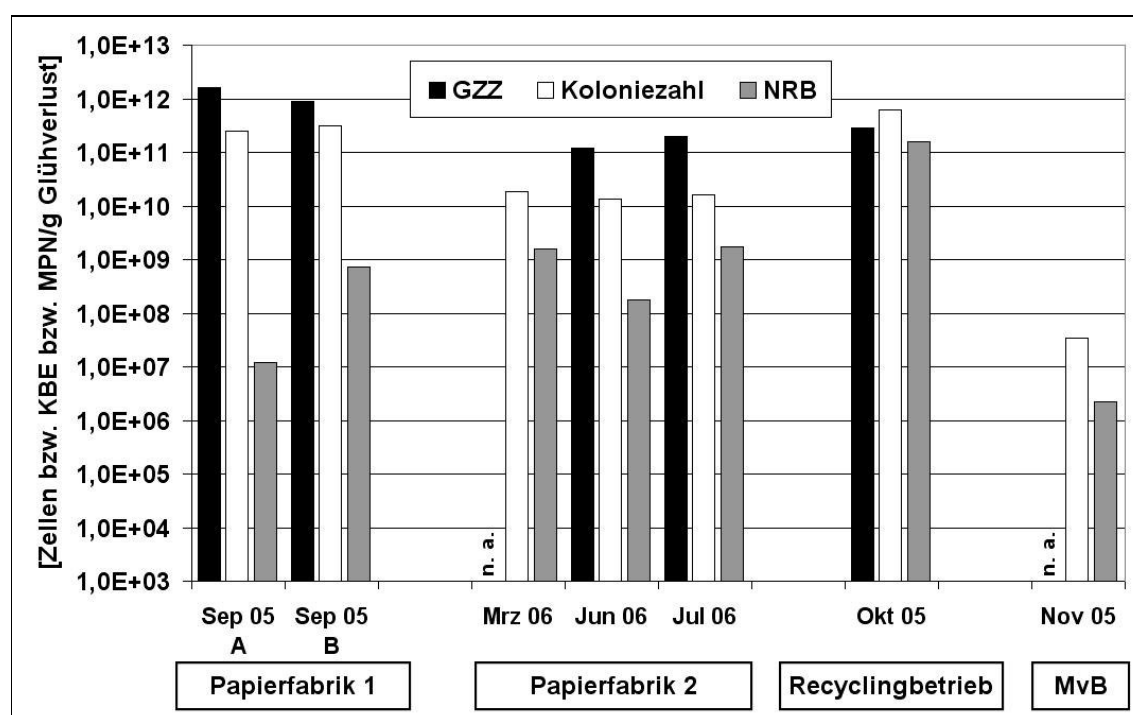


Abbildung 4.25: Analysenergebnisse für GZZ, Koloniezahl und NRB. Darstellung der Biofilmpuben aus vier verschiedenen Industriebetrieben. MvB, metallverarbeitender Betrieb; n. a., nicht auswertbar.

Alle vier untersuchten Betriebe wiesen eine unterschiedliche Verteilung für die drei mikrobiologischen Parameter auf. Beim Recyclingbetrieb wurden in den Biofilmpuben sowohl für die Gesamtzellzahl als auch für die Koloniezahl und die nitratreduzierenden Bakterien mehr als  $10^{11}$  Zellen/g Glühverlust bestimmt. Im Vergleich dazu wies die Papierfabrik 1 zwar auch ähnlich hohe Werte für die Gesamtzellzahl und die Koloniezahl auf, allerdings konnten im Biofilm deutlich weniger Nitratreduzierer nachgewiesen werden.

Die Papierfabrik 1 hatte die größte Übereinstimmung bezüglich der Relation der einzelnen mikrobiologischen Parameter mit der Papierfabrik 2. Nitratreduzierende Bakterien konnten in gleicher Größenordnung von  $10^8$  bis  $10^9$  MPN Nitratreduzierer/g Glühverlust im Biofilm gefunden werden. Bei der Gesamtzellzahl und Koloniezahl wurden allerdings um eine Zehnerpotenz niedrigere Werte für die Papierfabrik 2 ermittelt.

Der metallverarbeitende Betrieb wies insgesamt die niedrigste Anzahl kultivierbarer Mikroorganismen und nitratreduzierenden Bakterien in den Biofilmpuben auf. Es wurden nur  $3 \times 10^7$  KBE/g Glühverlust und nur  $2 \times 10^6$  Nitratreduzierer/g Glühverlust nachgewiesen.

Eine tabellarische Übersicht der Zahlenwerte aus den untersuchten Biofilmpuben für die GZZ, die Koloniezahl auf R2A-Agar, die NRB und der Berechnung des prozentualen Anteils der Koloniezahl an der GZZ sowie der NRB an der GZZ ist im folgenden dargestellt (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: Übersicht der Biofilmpuben aus den vier Betriebsuntersuchungen für die Gesamtzellzahl (GZZ), die Koloniezahl (KZ) und die Nitratreduzierer (NRB). Berechnung der Anteile der KZ bzw. der NRB an der GZZ in Prozent. PF, Papierfabrik; RB, Recyclingbetrieb; MvB, metallverarbeitender Betrieb; n. a., nicht auswertbar.

Probe	GZZ [Zellen/g Glühverlust]	Koloniezahl (R2A) [KBE/g Glühverlust]	Anteil KZ an GZZ [%]	NRB [MPN/g Glühverlust]	Anteil NRB an der GZZ [%]
PF1 Probe 1	$1,6 \times 10^{12}$	$2,5 \times 10^{11}$	15,4	$1,2 \times 10^7$	< 0,1
PF1 Probe 2	$9,0 \times 10^{11}$	$3,1 \times 10^{11}$	34,9	$7,2 \times 10^8$	0,1
PF 2 Probe 1	n. a.	$1,8 \times 10^{10}$	n. a.	$1,5 \times 10^9$	n. a.
PF2 Probe 2	$1,2 \times 10^{11}$	$1,3 \times 10^{10}$	11,1	$1,7 \times 10^8$	0,1
PF2 Probe 3	$2,0 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^{10}$	8,2	$1,7 \times 10^9$	0,9
RB Probe 1	$2,8 \times 10^{11}$	$6,3 \times 10^{11}$	> 100*	$1,5 \times 10^{11}$	54,8
MvB Probe 1	n. a.	$3,4 \times 10^7$	n. a.	$2,2 \times 10^6$	n. a.

\* rechnerisch ergab sich ein Wert > 100 %, da methodenbedingt die Untersuchungsergebnisse mit unterschiedlichen statistischen Fehlern behaftet sind.

Besonders auffällig sind die Zahlen für den Recyclingbetrieb, da die prozentualen Anteile im Bezug zur GZZ hier sehr hoch waren. Die Hälfte der in den Biofilmproben bestimmten Zellen war in diesem Betrieb in der Lage, Nitrat zu verwerten. Bezog man die Koloniezahl auf die Gesamtzellzahl, ergab sich ein Wert von  $> 100\%$ , im Falle der NRB im Bezug zur GZZ wurde ein Wert von  $55\%$  ermittelt. Auch die Ergebnisse der Biofilmproben aus den beiden Papierfabriken 1 und 2 weisen mit  $8\%$  bis  $35\%$  hohe Anteile kultivierbarer Mikroorganismen an der GZZ auf, während der Anteil der NRB an der GZZ jeweils unter  $1\%$  liegt.

Analog der Zusammenstellung für die Biofilmproben wurden auch die mikrobiologischen Ergebnisse für die untersuchten Wasserproben aus den vier Industriebetrieben zusammengestellt (Abbildung 4.26).

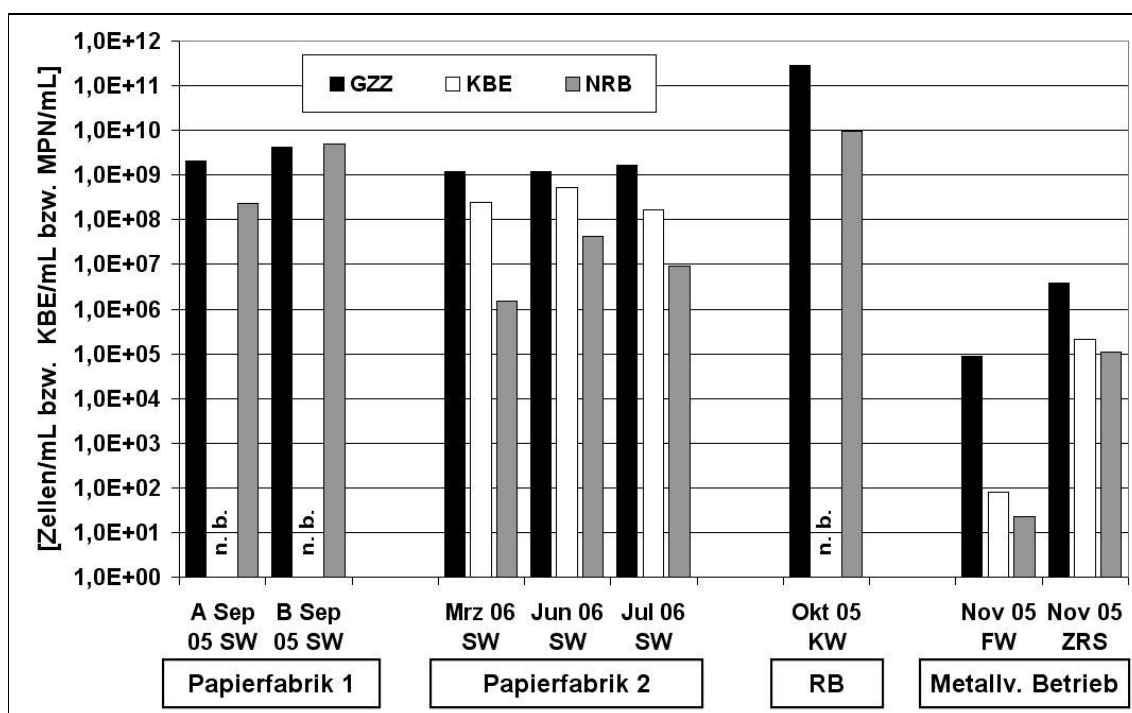


Abbildung 4.26: Analysenergebnisse für GZZ, Koloniezahl und NRB. Darstellung der Wasserproben aus vier verschiedenen Betriebsuntersuchungen. RB, Recyclingbetrieb; SW, Siebwasser; KW, Klarwasser; FW, Frischwasser; ZRS, Zulauf Reinigungsstufe; n. b., nicht bestimmt.

Wie bereits zuvor bei den Biofilm-Untersuchungen, wurden auch bei den untersuchten Wasserproben im metallverarbeitenden Betrieb die niedrigsten Zellzahlen in der Größenordnung von  $10^5 - 10^6$  Zellen/mL bestimmt. Die höchsten Zellzahlen für Wasserproben wurden ebenfalls wie bei den Biofilm-Analysen zuvor im Recyclingbetrieb mit  $10^{10} - 10^{11}$  Zellen/mL nachgewiesen.

Auffällig ist bei einem Vergleich der Ergebnisse für Wasserproben und Biofilmproben aus der Papierfabrik 1, dass in den Wasserproben Werte in ähnlicher Größenordnung für Nitratreduzierer und GZZ bestimmt wurden, während im Biofilm (Abbildung 4.25) mit der GZZ-Methode um drei bis fünf Logstufen mehr Zellen als Nitratreduzierer/g Glühverlust nachgewiesen wurden.

Für die Papierfabrik 2 konnte sowohl in den Biofilmproben als auch in den Wasserproben eine ähnliche Verteilung für die GZZ-, die Koloniezahl- und auch die NRB gefunden werden.

Eine tabellarische Übersicht der Zahlenwerte aus den untersuchten Wasserproben für die GZZ, die Koloniezahl auf R2A-Agar, die NRB und der Berechnung des prozentualen Anteils der Koloniezahl an der GZZ sowie der NRB an der GZZ ist im folgenden dargestellt (Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8: Übersicht der Wasserproben aus den vier Betriebsuntersuchungen für die Gesamtzellzahl (GZZ), die Koloniezahl (KZ) und die Nitratreduzierer (NRB). Berechnung der Anteile der KZ bzw. der NRB an der GZZ in Prozent. PF, Papierfabrik; RB, Recyclingbetrieb; MvB, metallverarbeitender Betrieb; SW, Siebwasser; SWÜ, Siebwasser Überstand; KW, Klarwasser; FW, Frischwasser; ZRS, Zulauf Reinigungsstufe; n. a., nicht auswertbar.

Probe	GZZ [Zellen/mL]	Koloniezahl (R2A) [KBE/mL]	Anteil KZ an der GZZ [%]	NRB [MPN/mL]	Anteil NRB an der GZZ [%]
PF1 Probe 1 SW	$2,0 \times 10^9$	n. a.	n. a.	$2,3 \times 10^8$	11,4
PF1 Probe 2 SW	$4,2 \times 10^9$	n. a.	n. a.	$4,9 \times 10^9$	> 100*
PF 2 Probe 1 SW	$1,2 \times 10^9$	$2,5 \times 10^8$	20,2	$1,5 \times 10^6$	0,1
PF2 Probe 2 SW	$1,2 \times 10^9$	$5,3 \times 10^8$	44,7	$4,3 \times 10^7$	3,6
PF2 Probe 3 SW	$1,6 \times 10^9$	$1,7 \times 10^8$	10,4	$9,3 \times 10^6$	0,6
PF 2 Probe 3 SWÜ	$1,3 \times 10^{10}$	$4,7 \times 10^8$	3,5	$9,3 \times 10^5$	< 0,1
RB Probe 4 KW	$2,8 \times 10^{11}$	n. a.	n. a.	$9,3 \times 10^9$	3,3
MvB Probe 1 FW	$8,8 \times 10^4$	$8,0 \times 10^1$	0,1	$2,3 \times 10^1$	< 0,1
MvB Probe 1 ZRS	$3,8 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	5,5	$1,1 \times 10^5$	2,9

\* rechnerisch ergab sich ein Wert > 100 %, da methodenbedingt die Untersuchungsergebnisse mit unterschiedlichen statistischen Fehlern behaftet sind.

Im Falle der Wasserproben aus der Papierfabrik 1 waren die hohen prozentualen Anteile für NRB an der GZZ besonders auffällig. Ein hoher Anteil an Zellen war in diesen Wasserproben in der Lage, Nitrat zu verwerten. Die Ergebnisse aus der Papierfabrik 2 wiesen beim Anteil der Koloniezahl an der GZZ hohe Werte im zweistelligen Prozentbereich auf und deuten auf gute Nährstoffbedingungen für Mikroorganismen in dem Wasserkreislauf hin. Für die anderen untersuchten Betriebe wurden zwar geringere Anteile berechnet, sie lagen aber sowohl bei der Koloniezahl als auch bei den NRB mehrfach im einstelligen Prozentbereich. Im Fall des Siebwasserüberstandes aus der Papierfabrik 2 und des Frischwassers aus dem metallverarbeitenden Betrieb wurden für die NRB nur sehr geringe Anteile an der GZZ < 0,1 % nachgewiesen.

Für einen direkten Vergleich zwischen den Analysenergebnissen aus den Wasserproben mit denen der Biofilmpuben sind in Tabelle 4.9 alle Angaben für GZZ, Koloniezahl und NRB auf das Feuchtgewicht Biofilm berechnet worden und den Ergebnissen der Wasserproben pro mL gegenübergestellt.

Tabelle 4.9: Übersicht der Wasser- und Biofilmpuben aus den vier Betriebsuntersuchungen für die Parameter: Gesamtzellzahl (GZZ), Koloniezahl und Nitratreduzierer (NRB). PF, Papierfabrik; RB, Recyclingbetrieb; MvB, metallverarbeitender Betrieb; WP, Wasserprobe; BF, Biofilm; n. a., nicht auswertbar; n. b., nicht bestimmt.

Parameter Probe	GZZ		Koloniezahl (R2A)		NRB	
	WP [Zellen/mL]	BF [Zellen/g]	WP [KBE/mL]	BF [KBE/g]	WP [MPN/mL]	BF [MPN/g]
PF 1 Probe 6	$2,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^{11}$	n. b.	$1,4 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^8$	$7,5 \times 10^5$
PF 1 Probe 7	$4,2 \times 10^9$	$6,1 \times 10^{10}$	n. b.	$2,3 \times 10^9$	$4,9 \times 10^9$	$4,9 \times 10^7$
PF 2 Probe 1	$1,2 \times 10^9$	n. a.	$2,5 \times 10^8$	$8,9 \times 10^8$	$1,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^7$
PF 2 Probe 2	$1,2 \times 10^9$	$6,5 \times 10^9$	$5,3 \times 10^8$	$7,2 \times 10^8$	$4,3 \times 10^7$	$9,3 \times 10^6$
PF 2 Probe 3	$1,6 \times 10^9$	$1,1 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$	$8,8 \times 10^8$	$9,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^7$
RB Probe 4	$6,5 \times 10^9$	$2,0 \times 10^{10}$	n. b.	n. b.	$9,3 \times 10^9$	$1,1 \times 10^{10}$
MvB Probe 1 ZRS	$3,8 \times 10^6$	n. a.	$2,1 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$

Während alle Analysenergebnisse der Wasserproben für die GZZ in einem engen Bereich zwischen  $1 \times 10^9$  und  $7 \times 10^9$  Zellen/mL lagen, variierten die Werte der entsprechenden Biofilmpuben zwischen  $7 \times 10^9$  und  $1 \times 10^{11}$  Zellen/g Feuchtgewicht in einem größeren Bereich und waren um ca. eine Zehnerpotenz größer, als die entsprechenden Zellzahlen in den Wasserproben.

Im Fall der Papierfabrik 2 konnten für die Koloniezahl ungefähr gleich große Werte im Biofilm und in der Wasserprobe bestimmt werden, tendenziell waren aber auch hier die Werte im Biofilm etwas größer. Bei der Analyse des Biofilms aus dem metallverarbeitenden Betrieb wurde mit  $2 \times 10^6$  KBE/mL eine Koloniezahl bestimmt, die um eine Zehnerpotenz größer war, als die Koloniezahl in der Wasserprobe. Generell lagen die ermittelten Koloniezahlen aber um 2 – 3 Logstufen niedriger als bei den Proben aus den übrigen drei Industriebetrieben.

Die Analysen der NRB zeigten ein etwas anders Bild, hier konnte nur im Fall des Recyclingbetriebes und bei zwei Probenahmen in der Papierfabrik 2 höhere Werte im Biofilm als in der Wasserprobe bestimmt werden. Im metallverarbeitenden Betrieb wurde eine gleich große Anzahl an NRB in beiden Proben gefunden und in der Papierfabrik 1 wurden im Biofilm ca. zwei Zehnerpotenzen weniger NRB nachgewiesen als in den Wasserproben. Für die Papierfabrik 2 konnte keine eindeutige Aussage gemacht werden, da die Ergebnisse bei den drei Probenahmen unterschiedlich ausfielen. Einmal wurden in der Wasserprobe um eine Zehnerpotenz mehr NRB nachgewiesen und zweimal konnten im Biofilm um eine Zehnerpotenz höhere Werte als in der Wasserprobe bestimmt werden. Die höchsten Zellzahlen für NRB wurden im Recyclingbetrieb sowohl in der Wasserprobe als auch in der Biofilmprobe mit ca.  $10^{10}$  MPN/mL bzw.  $10^{10}$  MPN/g ermittelt. Im Gegensatz dazu wurden um 5 Logstufen geringere Zellzahlen für NRB in Wasser- und auch Biofilmproben aus dem metallverarbeitenden Betrieb nachgewiesen.

#### **4.4 Nachweis der mikrobiologischen Nitratreduktion im industriellen Wasserkreislauf**

In den Kapiteln 4.1 und 4.2 der vorliegenden Arbeit wurden Analysenergebnisse vorgestellt, die belegen, dass eine Abnahme der Nitratkonzentration nach Zudosierung von ANS im Fall von drei der vier Betriebsuntersuchungen innerhalb von wenigen Stunden bzw. Tagen stattgefunden hat und dass Mikroorganismen sowohl in Biofilmen als auch in Wasserproben nachgewiesen wurden, die prinzipiell in der Lage sind, Nitrat zu verwerten.

Ein Zusammenhang zwischen den im Wassersystem vorhandenen Mikroorganismen und der Abnahme der Nitratkonzentration, war durch die bisherigen Untersuchungen allerdings noch nicht nachweisbar. Um den biologischen Nitratabbau exemplarisch direkt vor Ort in einem der untersuchten Betriebe nachzuweisen, wurde ein Becherglas-Reaktor-Versuch in der Papierfabrik 1 mit drei Ansätzen durchgeführt (Kapitel 3.6). Die drei Bechergläser waren mit Siebwasser aus dem Wasserkreislauf der Papierfabrik 1 befüllt worden und die Nitratkonzentration war zu Beginn des Versuches mit Natriumnitrat-Lösung auf 250 mg/L eingestellt worden.



- Reaktor 1: Kontrollreaktor. Das Siebwasser wurde bis zum Sieden erhitzt, um alle enthaltenen Mikroorganismen abzutöten und auf diese Weise einen mikrobiologischen Nitratabbau zu unterbinden.
- Reaktor 2: Normale Siebwassertemperatur von 35 °C – 40 °C.
- Reaktor 3: Normale Siebwassertemperatur von 35 °C – 40 °C. Zugabe von 13,4 g Biofilm aus der Papierfabrik 1.

In Zeitintervallen von 45 min wurde in allen drei Ansätzen der Nitratgehalt photometrisch bestimmt (Abbildung 4.27).

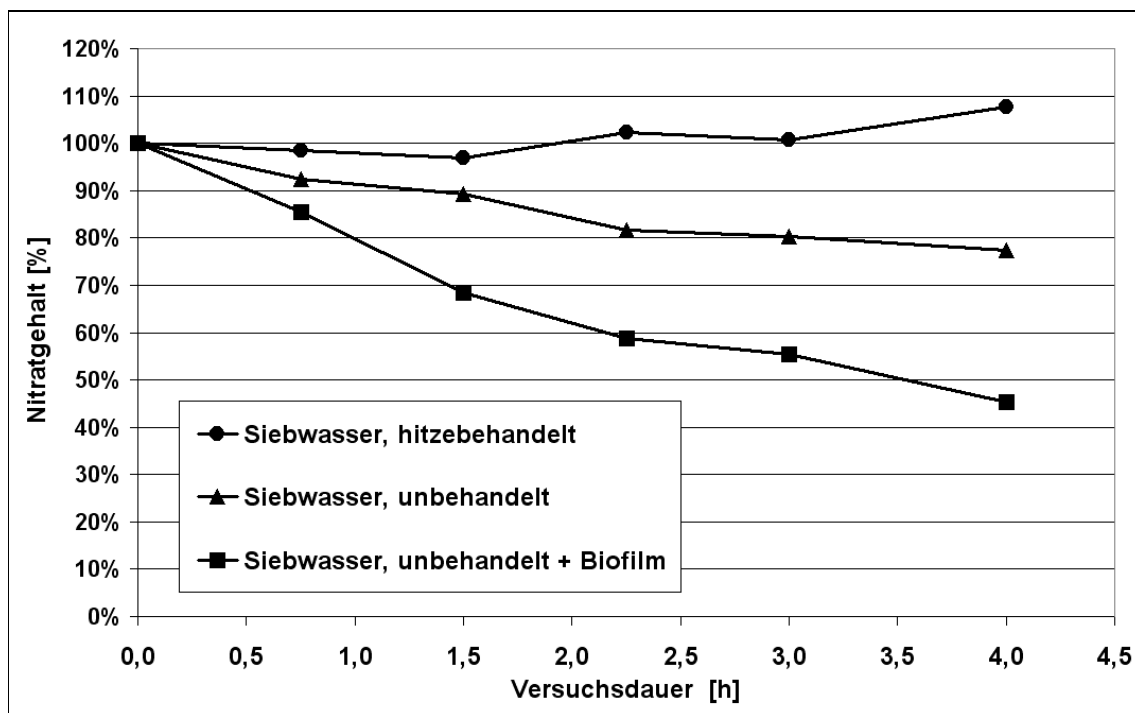


Abbildung 4.27: Verlauf der Nitratkonzentration in Prozent, im Bezug zum Startwert (100 %), für die drei Becherglas-Reaktoren. 100 % entsprechen 250 mg/L Nitrat.

Innerhalb der Versuchsdauer von vier Stunden zeigte der hitzebehandelte Kontrollreaktor keine erkennbare Abnahme im Bezug auf die Nitratkonzentration. Bei dem Batch-Reaktor, der nur mit Wasser aus dem Kreislauf der Papierfabrik befüllt war und bei 35 °C gehalten wurde, konnte ein Rückgang der Nitratkonzentration auf 77 % der Startkonzentration festgestellt. Dies entspricht einer Abnahme von 23 % im Bezug auf die ursprüngliche Nitratkonzentration innerhalb von 4 Stunden.

Dem Reaktor 3 war zusätzlich frisch entnommener Biofilm aus dem Überlaufbecken der Druckentspannungsflotation zugegeben worden. In dem mit dem Biofilm beaufschlagten Reaktor konnte eine Abnahme der Nitratkonzentration von 55 %

festgestellt werden, so dass nach vier Stunden Versuchsdauer nur noch 45 % der ursprünglichen Nitratkonzentration nachgewiesen wurden.

Der pH-Wert blieb in allen drei Bechergläsern über den gesamten Versuchszeitraum relativ konstant bei ca. pH 6,3 und schwankte um maximal 0,2 pH-Einheiten. Die Leitfähigkeit blieb im gesamten Versuchszeitraum für Ansatz 2 und Ansatz 3 bei 12,0 mS/cm. Bei Ansatz 1 stieg die Leitfähigkeit mit steigender Reaktortemperatur auf ca. 14 – 16 mS/cm an. Vermutlich sind aufgrund des hohen CSB-Gehaltes im Kreislaufwasser (ca. 17 g/mL O<sub>2</sub>) hier thermische Spaltprozesse der Kohlenstoffverbindungen für die Erhöhung der Leitfähigkeit verantwortlich.

#### **4.5 Etablierung eines Batch-Reaktor-Systems**

Um die mikrobiellen Vorgänge in Wasserkreislaufsystemen von Papierfabriken im Labor eingehender untersuchen zu können, sollte eine Labor-Versuchsanlage zur Simulation realer Verhältnisse in Wasserkreisläufen von Papierfabriken entwickelt werden. Die Labor-Versuchsanlage sollte ein Wachstum von Mikroorganismen im Wasser und auf Oberflächen ermöglichen und wurde als Batch-Reaktor konzipiert, um den mikrobiellen Nitratabbau unter kontrollierten Bedingungen ablaufen zu lassen. Der Batch-Reaktor wurde als Becherglas-Reaktor auf dem Heizrührer bei 40 °C gerührt und mit einer definierten Nitratkonzentration bei pH 7 gestartet. Da in der Praxis meist Oberflächen aus Stahl vorhanden sind, wurden auch im Laborreaktor Aufwuchsflächen aus Stahl, in Form von Coupons (30 mm x 90 mm) verwendet (Kapitel 3.5).

##### **4.5.1 Auswahl eines geeigneten Nährmediums**

Um gezielt die Wachstumsbedingungen und die Aktivität von nitratreduzierenden Bakterien (NRB) untersuchen zu können, musste ein geeignetes Nährmedium für den Batch-Reaktor gefunden werden, um Zellwachstum und Nitratabbau zu gewährleisten. Deshalb wurden zunächst Vorversuche mit verschiedenen Nährmedien im Batch-Reaktor-System mit Kreislaufwasser aus der Papierfabrik 1 durchgeführt. Alle zwei Tage fand ein kompletter Wasserwechsel statt. Nach 40 Tagen Versuchsdauer bei einem pH-Wert von pH 6,8 und einer Temperatur von 40 °C war visuell kein Biofilm auf den Stahlcoupons erkennbar gewesen. In einem Reaktorversuch mit gleichen Bedingungen wie zuvor und zusätzlicher Zugabe von Kaliumnitrat, entsprechend einer Nitratkonzentration von 500 mg/L im Batch-Reaktor, konnte erneut visuell kein Biofilm auf den Stahl-Coupons beobachtet werden.

Um die Entwicklung eines Biofilms auf den eingesetzten Coupons voranzutreiben, sollte im nächsten Reaktorlauf ein Inokulum zugesetzt werden. Da in der Papierfabrik 1 bereits ein mikrobieller Nitratabbau nachgewiesen worden war (Kapitel 4.3), wurde dieser Betrieb als Quelle für ein solches Inokulum ausgewählt. Das Inokulum aus der Papierfabrik 1 wies eine Gesamtzellzahl von  $1,5 \times 10^{10}$  Zellen/mL auf und enthielt eine Mischpopulation aus verschiedensten Mikroorganismen. Die Koloniezahl auf R2A bzw. CASO-Agar betrug in beiden Fällen  $4 \times 10^8$  KBE/mL. Mit Hilfe der MPN-Methode wurden im Inokulum nitratreduzierende Bakterien in einer Größenordnung von  $7 \times 10^8$  MPN/mL nachgewiesen.

Neben den Mikroorganismen brachte das Inokulum aus der Papierfabrik 1 auch gleichzeitig Zellulosefasern in den Batch-Reaktor ein, da es sich bei dem Inokulum um eine Dickstoffprobe aus dem Wasserkreislauf der Papierfabrik handelte.

Der erste beimpfte Reaktorlauf wurde mit sterilem Trinkwasser (Laborzapfhahn Universität Duisburg-Essen, Geibelstrasse) und Zugabe von 7,5 g Feuchtgewicht Dickstoff aus der Papierfabrik 1 als Inokulum, bei pH 7 und 40 °C durchgeführt. Nach 7 Tagen Versuchsdauer konnte ein schleimiger, weiß-grauer Biofilm auf den Stahlcoupons beobachtet werden. Bei der Analyse dieses Biofilms konnten Nitratreduzierer allerdings nur in einer Größenordnung von 120 MPN/cm<sup>2</sup> Couponoberfläche nach 7 Tagen Versuchsdauer nachgewiesen werden (Abbildung 4.28). Nach 14 Tagen Versuchsdauer hatte sich die Beschaffenheit des Biofilms kaum verändert und es wurden  $2 \times 10^3$  MPN/cm<sup>2</sup> Nitratreduzierer im Biofilm nachgewiesen. Beide Ergebnisse nach 7 Tagen und 14 Tagen Versuchsdauer waren im Hinblick auf die oben genannten Kriterien Zellwachstum und Nitratabbau nicht ausreichend.

Deshalb wurde ein Reaktorlauf mit sterilem deionisiertem Wasser mit Zugabe von Kaliumnitrat (Nitratkonzentration im Reaktor = 500 mg/L) eingestellt und erneut 7,5 g Inokulum aus der Papierfabrik 1 zugegeben. Der Reaktor wurde 14 Tage bei einem pH-Wert von pH 7 und einer Temperatur von 40 °C leicht gerührt. Auch in diesem Versuch konnte ein Biofilm auf den Coupons angezüchtet werden, der analysiert wurde. Im Biofilm konnten allerdings kaum nitratreduzierende Mikroorganismen ( $< 100$  MPN/cm<sup>2</sup>) nachgewiesen werden (Abbildung 4.30). Deshalb wurde ein weiterer Reaktorlauf konzipiert, bei dem anstelle von deionisiertem Wasser oder Trinkwasser ein künstliches Nährmedium und zwar eine halbkonzentrierte Nitratbouillon (Fa. Difco) verwendet wurde. Als Inokulum für den Reaktorlauf kamen ebenfalls 7,5 g Feuchtgewicht Dickstoff aus der Papierfabrik 1 zum Einsatz. Die Analysenergebnisse der Gesamtzellzahlbestimmung und der MPN-Bestimmung für

nitratreduzierende Bakterien aus diesem und den beiden vorangegangenen Reaktorläufen sind in Abbildung 4.28 zusammengefasst.

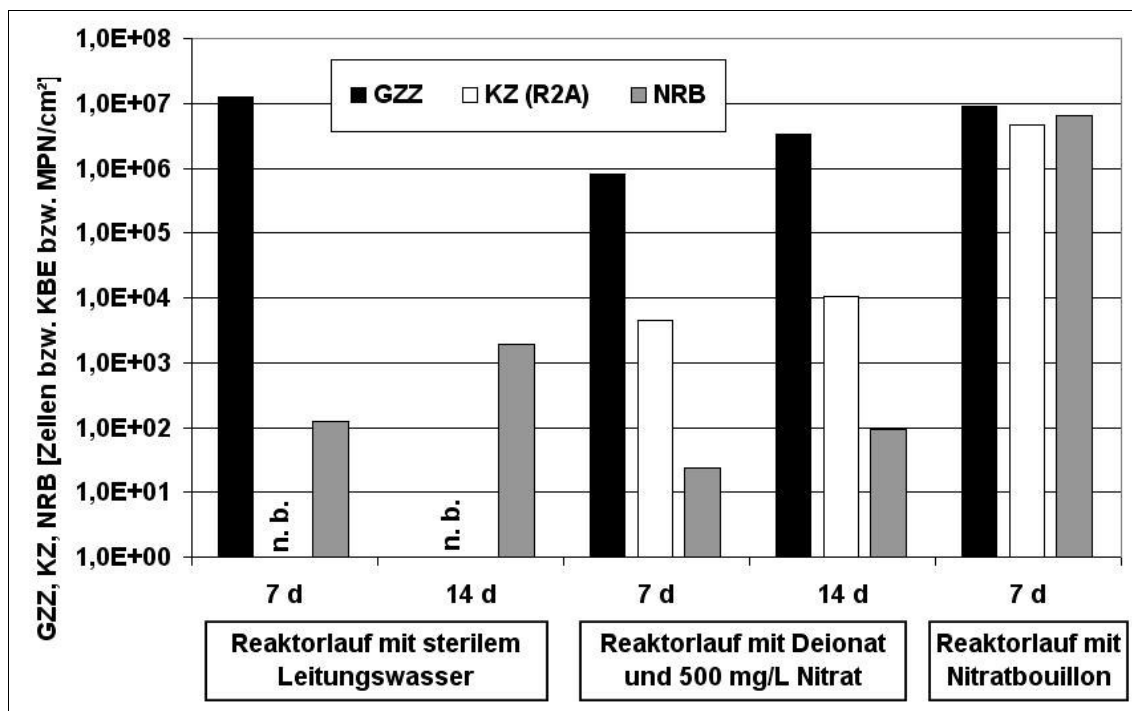


Abbildung 4.28: Gesamtzellzahl (GZZ), Koloniezahl, (KZ) und nitratreduzierende Bakterien (NRB) in Biofilmpuben aus drei verschiedenen Batch-Reaktorläufen nach 7 Tagen bzw. 14 Tagen Versuchsdauer bei pH 7 und 40 °C. Beim Reaktorlauf mit sterilem Trinkwasser konnte die GZZ nach 14 d aus technischen Gründen nicht ermittelt werden; n. b., nicht bestimmt.

In allen Ansätzen konnten nach 7 Tagen bzw. 14 Tagen Gesamtzellzahlen im Biofilm von ca.  $10^6$  bis  $10^7$  Zellen/cm<sup>2</sup> Couponfläche bestimmt werden. Davon waren allerdings bei den ersten beiden Reaktorläufen nur wenige Zellen in der Lage, Nitrat zu reduzieren. In der Biofilmprobe des 1. Reaktors konnten nur 120 MPN/cm<sup>2</sup> nach 7 Tagen und 1900 MPN/cm<sup>2</sup> nach 14 Tagen für NRB nachgewiesen werden. Im Biofilm des 2. Reaktors konnten nach 7 Tagen Versuchsdauer sogar nur 24 MPN/cm<sup>2</sup> gefunden werden. Nach weiteren 7 Tagen Versuchsdauer erhöhte sich dieser Wert für die NRB geringfügig auf 93 MPN/cm<sup>2</sup> Couponfläche. Die Koloniezahl lag um 2 – 3 Logstufen unter den Werten für die Gesamtzellzahl und deutet ebenfalls auf schlechte Wachstumsbedingungen in diesem Reaktorlauf hin.

Erst bei Verwendung von halbkonzentrierter Nitratbouillon als Medium für den 3. Reaktorlauf wurden im Biofilm, der auf den Stahlcoupons gewachsen war, höhere Werte für Nitratreduzierer bestimmt. Nach 7 Tagen Versuchsdauer konnten  $7 \times 10^6$  MPN/cm<sup>2</sup> und  $5 \times 10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> Couponoberfläche nachgewiesen werden. Diese Zahlenwerte für die NRB und Koloniezahl lagen in der gleichen

Größenordnung wie die ermittelte Gesamtzellzahl für den Biofilm ( $9 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup>).

Der visuelle Eindruck der Beläge auf den Stahlcoupons bestätigte diese unterschiedlichen Messergebnisse in den drei Reaktorläufen. Mit bloßem Auge betrachtet, waren die Beläge auf den Stahlcoupons aus dem dritten Reaktorlauf deutlich voluminöser als die Beläge, die im ersten oder zweiten Ansatz gewonnen werden konnten. Die Farbe des Biofilms war in allen Reaktorläufen aufgrund eingeschlossener Cellulosefasern hellgrau. Die Konsistenz konnte als schleimig bezeichnet werden.

Bezüglich der Biofilmanalysen aus den ersten beiden Reaktorläufen konnten bei der Koloniezahl-Bestimmung sowohl nach 7 Tagen als auch nach 14 Tagen Versuchsdauer mit  $10^3$  bis  $10^4$  KBE/cm<sup>2</sup> nur geringe Koloniezahlen ermittelt werden (Abbildung 4.29).

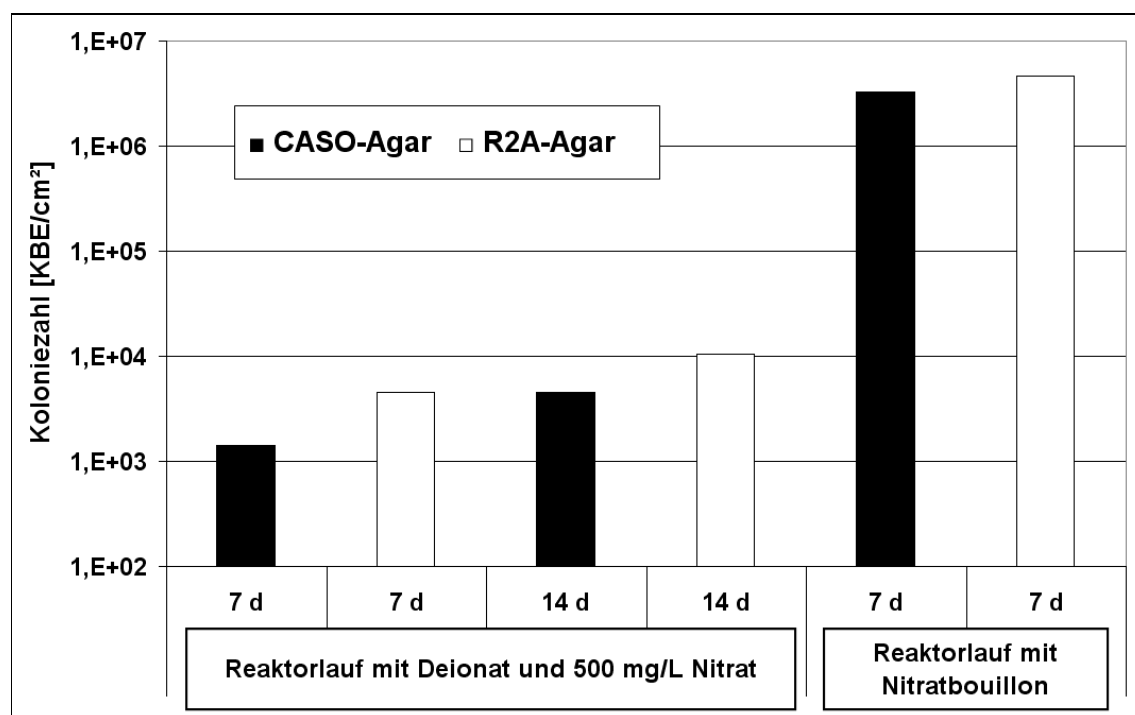


Abbildung 4.29: Koloniezahl von Biofilmpuben aus zwei Batch-Reaktorläufen nach 7 Tagen bzw. 14 Tagen Versuchsdauer bei pH 7 und 40 °C. Zu Beginn der Versuche wurde jedem Reaktor 7,5 g Inokulum aus der Papierfabrik 1 zugeben. Die Anzucht der Kolonien erfolgte auf CASO- und R2A-Agar für 7 Tage bei 40 °C.

Erst im Reaktorlauf mit Nitratbouillon war die Koloniezahl für den gewonnenen Biofilm von den Stahlcoupons, im Vergleich zum vorherigen 2. Ansatz deutlich größer. Es konnten sowohl auf R2A-Agar als auch auf CASO-Agar mehr als  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> bestimmt werden.

Auf beiden Nährmedien konnten annähernd die gleichen Ausbeuten an Koloniezahlen erhalten werden. Tendenziell wuchsen aber auf dem nährstoffarmen R2A-Agar mehr Kolonien als auf dem nährstoffreichen CASO-Agar.

Zusätzlich zu den Biofilmpuben von den Stahlcoupons, wurden auch Analysen der betreffenden Wasserproben aus den drei Reaktorläufen nach 7 Tagen bzw. 14 Tagen Versuchsdauer auf die gleichen mikrobiologischen Parameter GZZ, Koloniezahl und NRB durchgeführt (Abbildung 4.30).

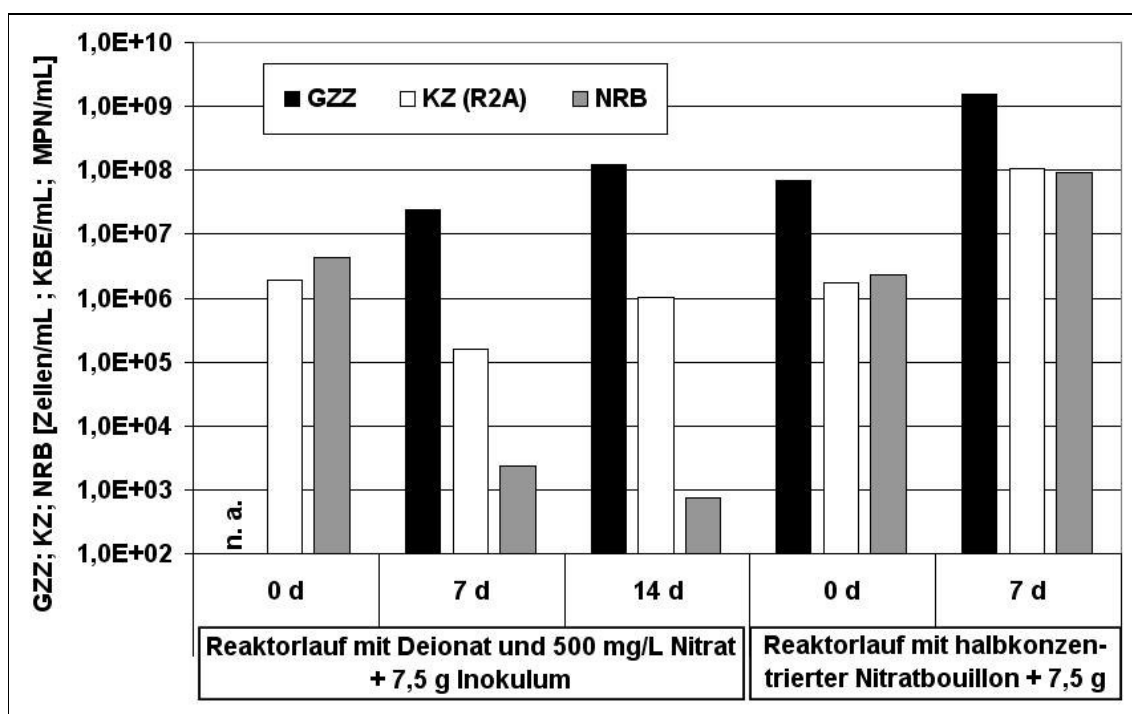


Abbildung 4.30: Gesamtzellzahl (GZZ), Koloniezahl, (KZ) und nitratreduzierende Bakterien (NRB) in Wasserproben aus zwei Batch-Reaktorläufen bei pH 7 und 40 °C. Beim Reaktorlauf mit deionisiertem Wasser konnte die GZZ aus technischen Gründen zu Beginn des Versuches nicht bestimmt werden.

Die Analysen der Gesamtzellzahl-Bestimmung ergaben im Falle des Reaktorlaufes mit deionisiertem Wasser und Zugabe von Kaliumnitrat nach 7 Tagen und 14 Tagen Werte zwischen  $10^7$  und  $10^8$  Zellen/mL Wasserprobe. Dieser Wert wurde auch im Reaktor mit Nitratbouillon zu Anfang des Versuches (0 d) bestimmt. Innerhalb von 7 Tagen Versuchsdauer stieg die GZZ im Reaktor mit Nitratbouillon auf  $2 \times 10^9$  Zellen/mL Wasserprobe an. Diese Werte deuten genau wie die vorherigen Ergebnisse für die Biofilmpuben darauf hin, dass im Falle des Reaktors mit deionisiertem Wasser und Zugabe von Kaliumnitrat kein Wachstum der Mikroorganismen stattgefunden hat.

Die Analysen für die NRB bestätigen diese Vermutung. Hier war für die Wasserproben aus dem Reaktor mit deionisiertem Wasser und Kaliumnitrat nach einer Versuchsdauer von 7 Tagen sogar eine deutliche Abnahme von anfangs  $4 \times 10^6$  MPN/mL auf  $2 \times 10^4$  MPN/mL zu erkennen. Nach weiteren 7 Tagen Inkubation wurde für diesen Reaktorlauf eine weitere Abnahme der NRB in der Wasserprobe auf  $8 \times 10^2$  MPN/mL nachgewiesen.

Beim Reaktorlauf mit halbkonzentrierter Nitratbouillon (Kapitel 3.5.3) konnte für alle drei bestimmten Parameter GZZ, Koloniezahl und NRB ein Anstieg von fast zwei Zehnerpotenzen pro mL Wasserprobe festgestellt werden. Die GZZ stieg von anfangs  $7 \times 10^7$  Zellen/mL nach 7 Tagen Versuchsdauer auf  $2 \times 10^9$  Zellen/mL, die Koloniezahl erhöhte sich von anfangs  $2 \times 10^6$  KBE/mL innerhalb von 7 Tagen auf  $1 \times 10^8$  KBE/mL und die NRB nahmen von  $2 \times 10^6$  MPN/mL nach 7 Tagen Versuchsdauer auf  $9 \times 10^7$  MPN/mL zu.

Im Falle des Reaktorlaufes mit deionisiertem Wasser und Kaliumnitrat hatten die anfangs bestimmten Koloniezahlen von  $2 \times 10^6$  KBE/mL innerhalb von 7 Tagen Versuchsdauer auf beiden Nährmedien deutlich abgenommen (Abbildung 4.31).

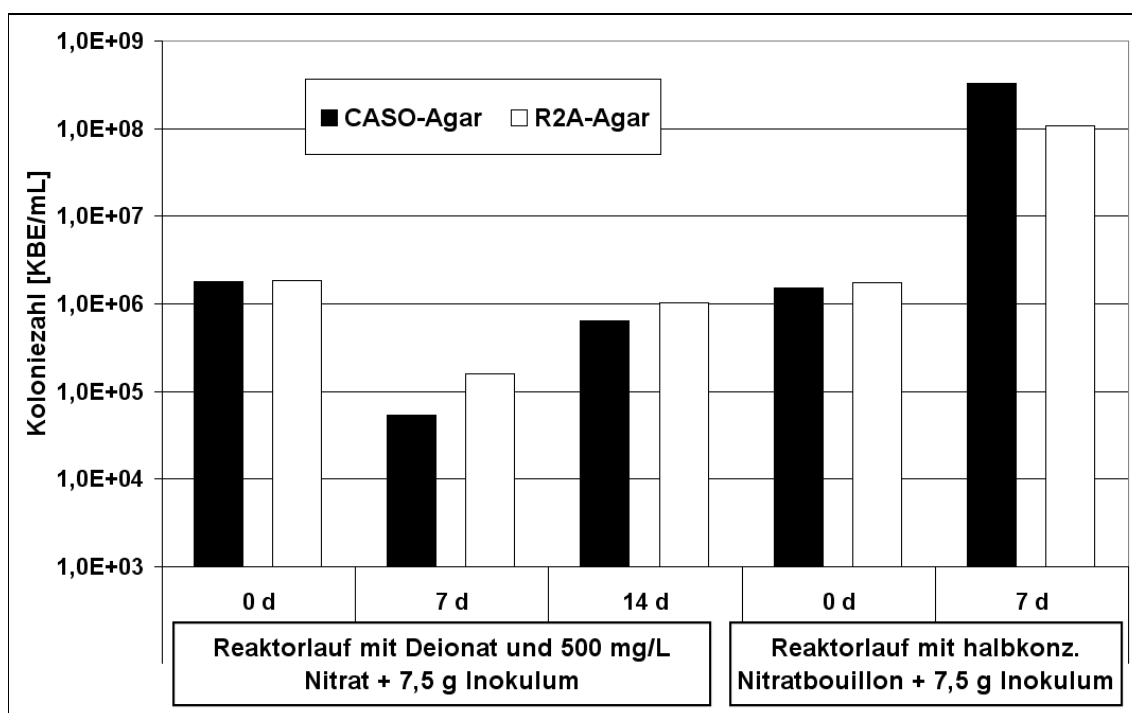


Abbildung 4.31: Koloniezahl von Wasserproben aus zwei Batch-Reaktorläufen nach 7 Tagen bzw. 14 Tagen Versuchsdauer bei pH 7 und 40 °C. Zu Beginn der Versuche wurde jedem Reaktor 7,5 g Inokulum aus der Papierfabrik 1 zugeben. Die Anzucht der Kolonien erfolgte auf CASO- und R2A-Agar für 7 Tage bei 40 °C.

Es ergaben sich um mehr als eine Zehnerpotenz niedrigere Werte von  $5 \times 10^4$  KBE/mL (CASO) bzw.  $2 \times 10^5$  KBE/mL (R2A). Innerhalb der zweiten Woche nahmen die Koloniezahlen wieder leicht zu, doch auch nach 14 Tagen Versuchsdauer konnten die ursprünglichen Startwerte nicht wieder erreicht werden.

Beim Reaktorlauf mit halbkonzentrierter Nitratbouillon wurden zu Beginn des Versuches Koloniezahlen in gleicher Größenordnung wie beim vorherigen Reaktorlauf mit deionisiertem Wasser von  $2 \times 10^6$  KBE/mL sowohl auf CASO-Agar als auch auf R2A-Agar bestimmt (Abbildung 4.31). Nach 7 Tagen Versuchsdauer konnte im Gegensatz zum vorherigen Reaktorlauf aber eine Steigerung der Koloniezahl um zwei Zehnerpotenzen auf  $3 \times 10^8$  KBE/mL (CASO) bzw.  $1 \times 10^8$  KBE/mL (R2A) ermittelt werden. Genau wie im Fall der Biofilmpuben wurden sowohl auf CASO-Agar als auch auf R2A-Agar Koloniezahlen in gleicher Größenordnung ermittelt, tendenziell waren sie auf R2A-Agar etwas höher mit Ausnahme der Analysen vom 3. Reaktor nach einer Versuchsdauer von 7 Tagen.

#### **4.5.2 Zellwachstum im Batch-Reaktor**

Aufgrund des festgestellten Zellwachstums innerhalb von 7 Tagen bei der GZZ, der erhöhten Koloniezahl und Erhöhung der NRB wurden für den Batch-Reaktor mit halbkonzentrierter Nitratbouillon Analysen bezüglich der ersten Stunden bzw. Tage durchgeführt. Dieser Versuch hatte das Ziel, zu beobachten, wie schnell sich die Mikroorganismen im Batch-Reaktor-System mit halbkonzentrierter Nitratbouillon vermehren können. Eine Wachstumskurve sollte dabei anhand der Bestimmung der Gesamtzellzahl aufgenommen werden. Es wurde die gleiche Versuchsanordnung für den Reaktorlauf wie zuvor gewählt, diesmal wurden jedoch nur 4,0 g Feuchtgewicht Inokulum (Dickstoff aus der Papierfabrik 1) anstelle von 7,5 g zugegeben. Notwendig wurde diese Änderung, um die Probenentnahme und die mikrobiologischen Analysen der Wasserprobe sowie des Biofilms zu vereinfachen, denn die im Inokulum enthaltenen Cellulosefasern erschwerten diese Arbeiten. Der Reaktorlauf wurde insgesamt dreimal (Reaktorläufe A, B, C) bei pH 7 und 40 °C durchgeführt.

Die Dickstoffprobe aus der Papierfabrik 1 diente erneut als Inokulum für alle drei Reaktorversuche. Eine Dickstoffprobe wurde direkt nach der Probenahme in der Papierfabrik 1 im Tiefkühlschrank bei -78°C eingefroren und die benötigten Portionen wurden nach unterschiedlich langen Aufbewahrungszeiten entnommen. Für das Inokulum von Reaktor A betrug die Aufenthaltsdauer im Tiefkühlschrank 22 Tage, für Reaktor B waren es 71 Tage und für Reaktor C betrug die Aufbewahrungszeit 85 Tage.



Als weiterer Parameter für die Aktivität der Mikroorganismen im jeweiligen Reaktorlauf sollte die Geschwindigkeit des Nitratabbaus bestimmt werden. Die Nitratkonzentration in der Wasserprobe wurde innerhalb der ersten sieben Stunden dafür jeweils stündlich ermittelt (Abbildung 4.32). Danach erfolgten Analysen in größeren Zeitabständen nach 20 Stunden bzw. 24 Stunden Versuchsdauer und in einem Fall auch nach 40 Stunden.

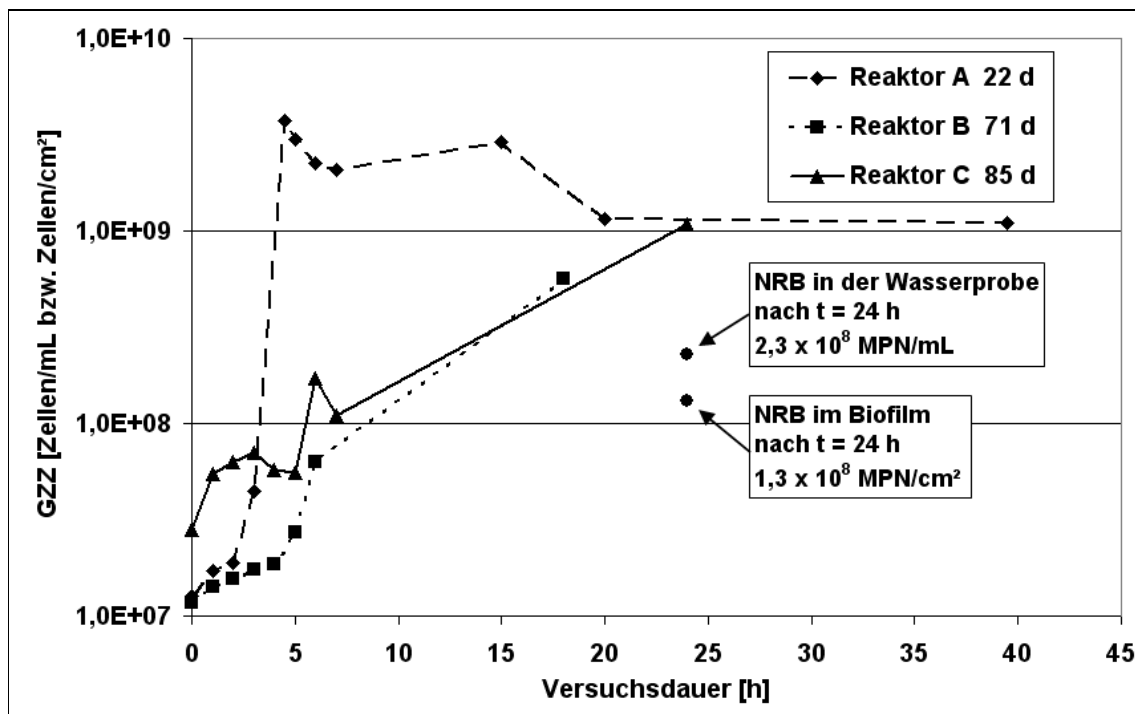


Abbildung 4.32: Verlauf der Gesamtzellzahl innerhalb von 40 h bei drei Reaktorläufen mit einem unterschiedlich lang im Tiefkühlschrank (-78 °C) gelagertem Inokulum. Die Reaktoren wurden bei pH 7 und 40°C betrieben. Zwei Bestimmungen für nitratreduzierende Bakterien (NRB) nach 24 h Versuchsdauer für Reaktor C sind als separate Datenpunkte angegeben.

Der Verlauf der Gesamtzellzahl zeigte im Falle des Reaktorlaufes A innerhalb der ersten vier Stunden eine Vermehrung von  $1 \times 10^7$  auf  $4 \times 10^9$  Zellen/mL. Danach blieb die Zellzahl über den gesamten Versuchszeitraum von 40 Stunden relativ konstant bei  $2 \times 10^9$  Zellen/mL. Die Reaktorläufe B und C ließen eine deutlich langsamere Vermehrung der Mikroorganismen erkennen. In beiden Fällen wurde nach 4 Stunden Versuchsdauer eine um zwei Logstufen niedrigere GZZ von nur  $2 \times 10^7$  bzw.  $6 \times 10^7$  Zellen/mL erhalten. Nach 6 bis 8 Stunden Versuchsdauer lag die GZZ in einer Größenordnung von  $10^8$  Zellen/mL immer noch niedriger, als dies beim Reaktorlauf A der Fall gewesen war. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die anfängliche Vermehrungsrate der Bakterien mit zunehmender Dauer der Lagerung des Inokulums im Tiefkühlschrank abnimmt.

Vergleicht man diese Ergebnisse für die Gesamtzellzahl (Abbildung 4.32) mit den Werten für die Nitratkonzentration (Abbildung 4.33), so war im Fall von Reaktor A bereits nach sieben Stunden Versuchsdauer der Nitratgehalt auf 1 % der Ausgangskonzentration gesunken, während im Falle von Reaktor B und C nach 7 Stunden Versuchsdauer noch immer über 70 % der Ausgangskonzentration Nitrat vorhanden waren. Nach insgesamt 24 Stunden Versuchsdauer wiesen alle angesetzten Reaktoren einen Nitratgehalt von < 1 % der Ursprungskonzentration auf.

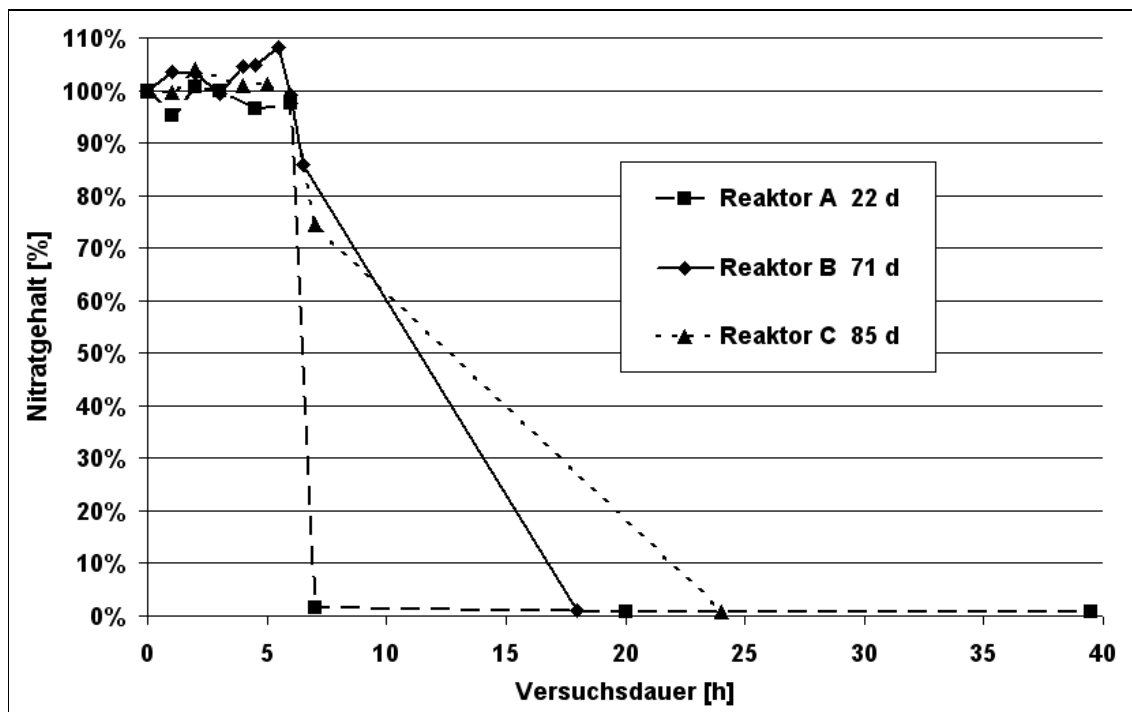


Abbildung 4.33: Nitratgehalt in den Reaktoren A, B und C im Bezug zum Startwert innerhalb von 40 h bei 40°C und pH 7. Der Nitratgehalt von 100% entspricht einer Nitratkonzentration von 330 mg/L. Es wurde das gleiche Inokulum aus der Papierfabrik 1 verwendet, aber nach unterschiedlichen Zeiten aus dem Tiefkühlschrank (-78 °C) entnommen.

Die bislang beschriebenen Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Vermehrung der Mikroorganismen, genauso wie die Geschwindigkeit des Nitratabbaus, mit zunehmender Aufenthaltsdauer des Inokulums im Tiefkühlschrank abnimmt. Dennoch konnte in allen drei Versuchen innerhalb von 24 Stunden mehr als 300 mg/L Nitrat durch die im Reaktor enthaltenen Mikroorganismen abgebaut werden.

Berechnet man die Logstufenveränderung der Gesamtzellzahl nach unterschiedlichen Versuchsdauern, so erhält man die folgenden Ergebnisse (Abbildung 4.34).

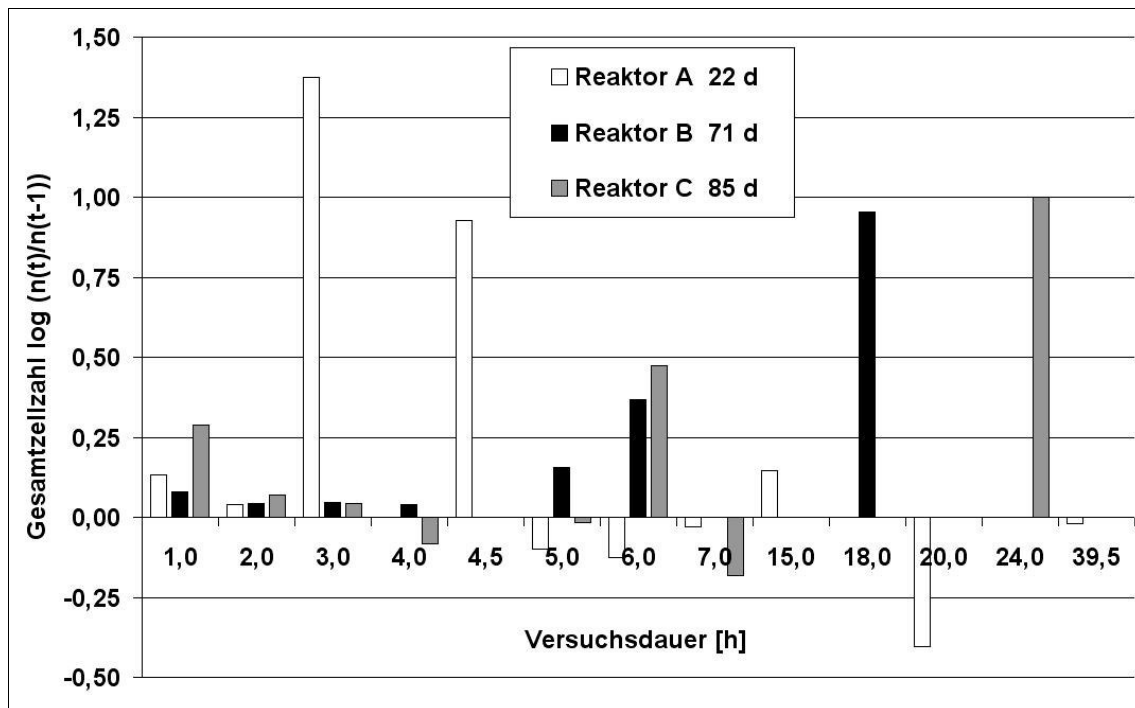


Abbildung 4.34: Logstufenveränderung der Gesamtzellzahl in den Batch-Reaktorläufen A, B und C in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Es wurde das gleiche Inokulum aus der Papierfabrik 1 verwendet, aber nach unterschiedlichen Zeiten aus dem Tiefkühlschrank (-78 °C) entnommen.

Die größten positiven Logstufenveränderungen ergaben sich für den Reaktor A zwischen der 3. und 5. Stunde, danach wurden nur noch geringe Veränderungen bei der Gesamtzellzahl beobachtet, bzw. es wurden negative Logstufenveränderungen gemessen, die auf einen Rückgang des mikrobiellen Wachstums hindeuten (Abbildung 4.34). Im Falle von Reaktor B wurde zwischen der 5. und 18. Stunde und im Falle von Reaktor C zwischen der 6. und 24. Stunde die größten Logstufenveränderungen bestimmt. Diese Verschiebung der Maxima bei der Logstufenveränderung hin zu längeren Versuchsdauern (Lag-Phase) weist darauf hin, dass die Vermehrungsrate der Mikroorganismen zu Beginn des Versuches mit zunehmender Gefrierdauer des Inokulums im Tiefkühlschrank abnimmt.

Aufgrund der Ergebnisse aus den Vorversuchen mit dem Batch-Reaktor-System wurden die folgenden Bedingungen für die nachfolgenden Batch-Reaktor-Versuche zum Nitratabbau festgelegt:

a) Für alle weiteren Untersuchungen mit dem Batch-Reaktor-System wurden nur noch Inokula aus der Papierfabrik 1 verwendet, die maximal 60 Tage im Tiefkühlschrank (bei -78 °C) aufbewahrt worden waren.

b) Als zweite Bedingung wurde für alle Reaktorversuche eine Versuchsdauer von 24 Stunden und in Ausnahmefällen von maximal 48 Stunden festgelegt.

c) Die Bestimmung der folgenden Parameter wurde festgelegt: Gesamtzellzahl und nitratreduzierende Bakterien der Wasserprobe bei Versuchsbeginn, und nach 24 Stunden Versuchsdauer. Biofilmpuben konnten erst nach 24 Stunden entnommen werden, da sich auf den sterilen Stahlcoupons erst ein Biofilm ausbilden musste. Genau wie zuvor bei den Wasserproben, wurde dann die Gesamtzellzahl und die Anzahl der nitratreduzierenden Bakterien bestimmt. Die Ergebnisse der Wasserproben wurden auf Volumen bezogen, die Ergebnisse der Biofilmpuben wurden auf die gesamte Aufwuchsfläche der entnommenen Coupons berechnet.

### 4.5.3 Charakterisierung des Inokulums

Eine Dickstoffprobe aus der Papierfabrik 1 wurde exemplarisch auf physikalische, chemische und mikrobiologische Parameter untersucht (Tabelle 4.10). Aufgrund des hohen Cellulosefaseranteils in der Probe, wurde zusätzlich zur Originalprobe auch ein Filtrat der Probe nach Filtration über ein 0,45 µm Filter analysiert.

Tabelle 4.10: Chemische Analysen eines Inokulums aus der Papierfabrik 1 vom 17.01.2006 für den Einsatz in Bioreaktoren. Linker Teil: Analyse der unverdünnten Originalprobe. Rechter Teil: Analyse des Filtrates nach Abtrennung der Zellstofffasern, Filtration durch 0,45 µm Filter.

Inokulum / Dickstoffprobe Papierfabrik 1 (Original)		Inokulum / Dickstoffprobe Papierfabrik 1 (Filtrat)	
Parameter	Messergebnis	Parameter	Messergebnis
TOC	13.000 mg/L *	DOC	7.000 mg/L
CSB	65.000 mg/L O <sub>2</sub>	CSB	18.000 mg/L O <sub>2</sub>
pH-Wert	6,79		
LF	12,11 mS/cm		
Chlorid	500 mg/L		
Nitrat	35,0 mg/L		

\* Der Faseranteil der Stoffprobe wurde nicht erfasst, da Fasern gerätetechnisch bedingt, abfiltriert wurden

Das beimpfte Nährmedium für Versuche zum Nitratabbau in den Batch-Reaktoren wies damit zu Beginn der Reaktorläufe die folgende Zusammensetzung auf (Tabelle 4.11).

Tabelle 4.11: Physikalische und chemische Beschaffenheit des Nährmediums für Versuche zum Nitratabbau in Batch-Reaktoren. (4 g Inokulum + 896 mL halbkonzentrierte Nitratbouillon nach 20 min Autoklavieren bei 121 °C).

Parameter	Angabe
Rinderextrakt	1.500 mg/L *
Pepton	2.000 mg/L *
Proteose-Pepton Nr. 3	500 mg/L *
CSB (gelöst, nach Filtration 0,45 µm)	6.100 mg/L O <sub>2</sub>
Nitrat	300 mg/L
Nitrit	0,02 mg/L
pH	7,08
Leitfähigkeit bei 20°C	1,25 mS/cm
Sauerstoff	3,47 mg/L
Redoxpotential	133 mV

\* Angaben des Herstellers (Difco)

#### 4.6 Einflussfaktoren auf den Nitratabbau in Bioreaktoren

Nach der Etablierung eines Batch-Reaktor-Systems für nitratreduzierende Bakterien in der Wasserphase und im Biofilm hatte man die Möglichkeit, einen bestimmten Parameter in der Versuchsanordnung auszuwählen und diesen gezielt zu verändern. Durch die Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ) lässt sich dann der Einfluss auf die Mikroorganismen insgesamt, und durch die MPN-Bestimmung für nitratreduzierende Bakterien (NRB) der Einfluss auf die nitratreduzierenden Bakterien in der Wasserphase und im Biofilm untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem Batch-Reaktor-System die folgenden Parameter gezielt verändert und der Einfluss auf den mikrobiellen Nitratabbau untersucht:

- Temperatur
- pH-Wert
- Leitfähigkeit, Salzgehalt (Chloridgehalt)
- Nitratgehalt
- Nitratquelle:  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$

Die ersten drei aufgelisteten Parameter sind in der Praxis von Industriebetrieben leicht zu messen und werden vielfach in Wasserkreisläufen bereits online erfasst und automatisch gesteuert. Deshalb wurde der Einfluss dieser drei Parameter in dieser Arbeit untersucht. Der Chloridgehalt, als exemplarisches Beispiel für den Salzgehalt wurde ebenso untersucht, wie der Einfluss des Nitratgehaltes und der Einfluss der Nitratquelle. Da diese drei Parameter in der Praxis durch die Zugabe von ANS beeinflusst werden, sind diese Untersuchungen ebenfalls von besonderer Bedeutung.

#### **4.6.1 Einfluss der Temperatur auf den Nitratabbau**

Die Temperatur ist ein zentraler Einflussfaktor für mikrobiologische Vorgänge. Mit steigender Temperatur gewinnen mikrobiologische Stoffwechselprozesse an Geschwindigkeit. Aber ab einer bestimmten maximalen Temperatur können die Stoffwechselprozesse auch wieder zum Erliegen kommen (Madigan und Martinko, 2006). Aufgrund dieser beiden Einflüsse weisen mikrobielle Stoffwechselprozesse ein Temperaturoptimum auf. Im Hinblick auf eine mögliche Optimierung des mikrobiellen Nitratabbaus in Wassersystemen ist die Kenntnis des Temperatureinflusses deshalb von besonderer Bedeutung.

In industriellen Wasserkreisläufen liegen meist Temperaturen im Bereich von 10 °C – 50 °C vor, aus diesem Grund sollte dieser Temperaturbereich mit dem Batch-Reaktor-System untersucht werden. Die Temperaturen von 20 °C – 50 °C wurden während der Versuche durch Verwendung von Heizrührern mit einem Kontaktthermometer konstant gehalten. Der Versuch bei 10 °C wurde durch Betrieb eines Reaktors im Kühlschrank auf der Rührplatte realisiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen auf die GZZ und die NRB in Wasser- und Biofilmpuben ist in Abbildung 4.35 dargestellt.

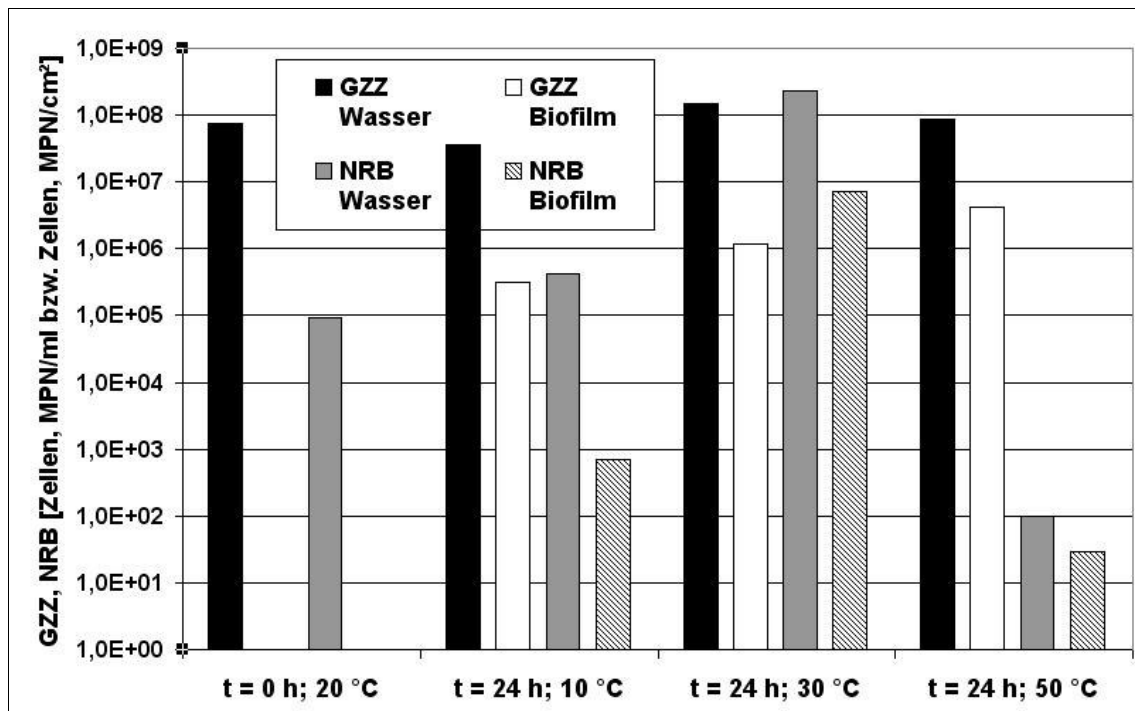


Abbildung 4.35: Gesamtzellzahl (GZZ) und nitratreduzierende Bakterien (NRB) in der Wasserphase und im Biofilm in Abhängigkeit von der Temperatur im Batch-Reaktor. Für die Nullmessung wurde exemplarisch die Wasserprobe des 30 °C Reaktors untersucht.

Die Gesamtzellzahl in der Wasserprobe hatte sich bei allen drei untersuchten Temperaturen von 10 °C, 30 °C und 50 °C innerhalb von 24 Stunden nur geringfügig verändert. Die Anzahl der nitratreduzierenden Bakterien war in der Wasserprobe von anfangs  $9 \times 10^4$  MPN/mL innerhalb von 24 Stunden bei einer Temperatur von 10 °C nur gering angestiegen auf  $4 \times 10^5$  MPN/mL. Bei 30 °C entwickelten sich hingegen bis zu  $2 \times 10^8$  MPN/mL Wasserprobe, genauso viele Zellen, wie mit der Gesamtzellzahlbestimmung ermittelt werden konnten. Im Batch-Reaktor, der bei 50 °C betrieben wurde, zeigte sich ein deutlich abweichendes Verhalten. Hier blieb zwar die Gesamtzellzahl in der Wasserprobe innerhalb von 24 Stunden konstant, allerdings verringerte sich die Anzahl der nitratreduzierenden Bakterien von anfangs  $9 \times 10^4$  MPN/mL um fast drei Logstufen auf  $1 \times 10^2$  MPN/mL in der Wasserprobe.

Die Gesamtzellzahl im Biofilm lag mit  $4 \times 10^6$  Zellen/cm² Couponoberfläche bei 50 °C am höchsten, bei 10 °C konnten noch  $3 \times 10^5$  Zellen/cm² im Biofilm gezählt werden und bei 30 °C waren es  $1 \times 10^6$  Zellen/cm². Diese drei ermittelten Werte für die Gesamtzellzahl im Biofilm lagen relativ dicht beieinander. Bei den Biofilmanalysen für die NRB im 50 °C Reaktor wurden nur 29 MPN/cm² Couponoberfläche nachgewiesen, während bei 30 °C die höchste Anzahl mit  $7 \times 10^6$  MPN/cm² bestimmt wurde. Bei 10 °C konnten nur  $7 \times 10^2$  MPN/cm² im Biofilm nachgewiesen werden.

Ausgehend von diesen Werten für die Anzahl der nitratreduzierenden Bakterien in der Wasserphase und im Biofilm, würde man in Abhängigkeit von der Temperatur einen unterschiedlich ausgeprägten Nitratabbau erwarten. Die experimentell ermittelten Werte für den Nitratabbau sind in Abbildung 4.36 dargestellt.

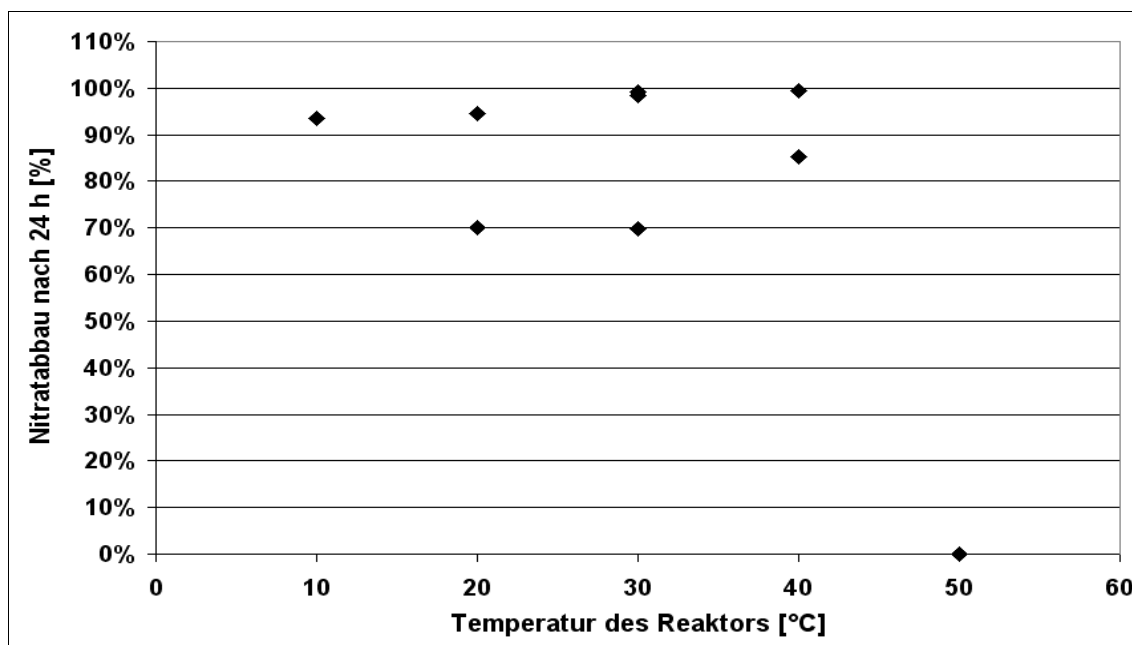


Abbildung 4.36: Nitratabbau in den Batch-Reaktoren nach 24 h in Abhängigkeit von der Reaktor-Temperatur. Der pH-Wert wurde zu Beginn der jeweiligen Versuche auf pH 7,1 eingestellt. Angabe des Nitratabbaus in Prozent vom Startwert (ca. 310 mg/L Nitrat).

Auffällig ist in Abbildung 4.36, dass bei einer Reaktor-Temperatur von 50 °C kein Nitratabbau beobachtet werden konnte. Dies korreliert mit den zuvor ermittelten niedrigen Zellzahlen für nitratreduzierende Bakterien im Biofilm und in der Wasserphase aus Abbildung 4.35.

Bei allen weiteren Reaktorläufen mit niedrigerer Temperatur konnte innerhalb von 24 Stunden ein Nitratabbau von mindestens 70 % des Startwertes bis zum kompletten Nitratabbau (100%) festgestellt werden. Das Maximum für den Nitratabbau konnte bei einer Reaktortemperatur von 40 °C erhalten werden und mit zunehmender Reaktor-Temperatur von 10 °C bis auf 40 °C wurde ein steigender Nitratabbau beobachtet.

Bei zwei Versuchsreihen mit 20 °C, 30 °C und 40 °C wurden nach 48 Stunden nur noch Werte < 5 % der Startkonzentration für Nitrat ermittelt werden. Der Nitratabbau war also innerhalb von 48 Stunden nahezu vollständig abgelaufen, während sich nach 24 Stunden zwischen den beiden Reaktorläufen noch Unterschiede zeigten.



Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 4.37 der Nitratabbau innerhalb von 48 Stunden Versuchsdauer aus drei Reaktorläufen jeweils bei 30 °C wiedergegeben.

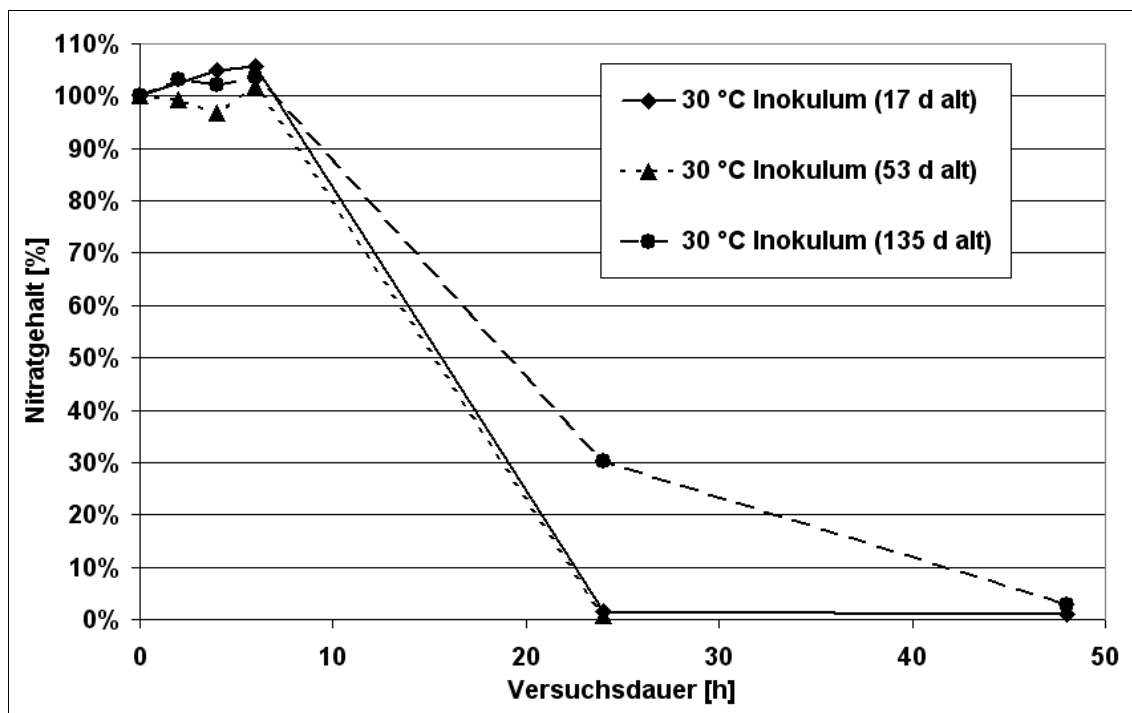


Abbildung 4.37: Nitratgehalt im Bezug zum Startwert (ca. 310 mg/L Nitrat) innerhalb von 2 Tagen bei konstant 30 °C und pH 7. Verschiedene Inokula, nach unterschiedlichen Aufbewahrungszeiten aus dem Tiefkühlschrank (-78 °C) entnommen.

Man erkennt in Abbildung 4.37, dass der Reaktorlauf mit dem 135 Tagen alten Inokulum nach 24 Stunden noch ca. 30 % der ursprünglichen Nitratkonzentration enthielt, während in den anderen beiden Ansätzen bereits nach 24 Stunden der Nitratabbau vollständig gewesen ist. Aufgrund der deutlich längeren Aufbewahrungszeit für das Inokulum bei -78 °C im Tiefkühlschrank scheint es zu einer teilweisen Inaktivierung der enthaltenen Mikroorganismen und damit zu einem zeitlich verzögerten Nitratabbau gekommen zu sein.

Setzt man die erhaltenen Gesamtzellzahlen für die Biofilm und Wasserproben aus den drei Reaktoransätzen A, B und C jeweils in Bezug zur anfänglich bestimmten Gesamtzellzahl, erkennt man den Unterschied zwischen dem Reaktorlauf A mit altem Inokulum und dem Reaktorlauf B mit frischem Inokulum (Abbildung 4.38).

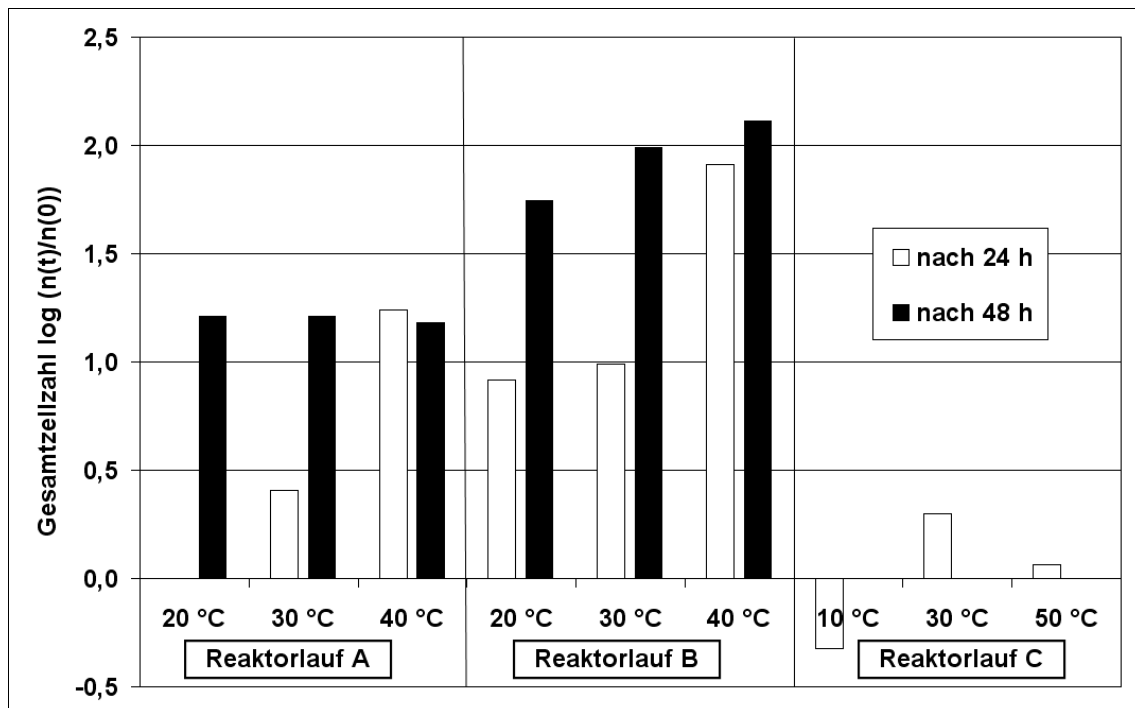


Abbildung 4.38: Logstufenveränderung der Gesamtzellzahl aus den Wasserproben der Reaktorläufe A, B und C. Bezug der GZZ nach 24 h bzw. 48 h auf die GZZ bei  $t = 0$  h.

Bei den beiden Reaktorläufen A und B war zu beobachten, dass bei 40 °C die Vermehrung der Bakterien bereits nach 24 Stunden abgeschlossen zu sein schien, da sich die Zellzahl nicht mehr wesentlich veränderte. Bei 20 °C und 30 °C fand jedoch noch weiteres Wachstum innerhalb der darauf folgenden 24 Stunden statt. Die Logstufenveränderungen des Reaktors B mit frischem Inokulum nach 24 Stunden entsprachen bzw. übertrafen bei 40 °C sogar die Zuwachsraten im Reaktors A mit altem Inokulum nach 48 Stunden Versuchsdauer. Beim Reaktorlauf C war deutlich zu erkennen, dass die Gesamtzellzahl innerhalb von 24 Stunden bei 10 °C rückläufig war und auch bei 50 °C nicht deutlich zunehmen konnte. Lediglich bei 30 °C fand ein geringes Wachstum der Gesamtzellzahl statt.

Diese Ergebnisse weisen auf bessere Wachstumsbedingungen für die im Reaktor enthaltenen Mikroorganismen mit zunehmender Temperatur hin. Die optimale Temperatur für mikrobielles Wachstum schien in den Reaktorläufen bei einer Temperatur von 40 °C zu sein.

#### 4.6.2 Einfluss des pH-Wertes auf den Nitratabbau

Wie die Temperatur, hat auch der pH-Wert einen bedeutenden Einfluss auf mikrobiologische Prozesse. Da in industriellen Wasserkreisläufen häufig neutrale pH-Werte um pH 7 vorliegen, wurde in dieser Arbeit der pH-Bereich von pH 5 – pH 9 untersucht. Im Batch-Reaktorversuch wurde dies im ersten Reaktor durch Zugabe von Salzsäure bis auf einen pH-Wert von pH 5 realisiert. Der zweite Reaktor wurde ohne pH-Einstellung bei pH 7 gefahren und der dritte Reaktor wurde mit Natronlauge auf pH 9 eingestellt.

Insgesamt wurde diese Reaktor-Serie mit drei verschiedenen Inokula innerhalb von fünf Monaten dreimal durchgeführt. Die Temperatur betrug bei allen drei Versuchsreihen 40 °C. Die Analysenergebnisse für die Gesamtzellzahlen in der Wasserphase und im Biofilm sind zunächst in Relation zum Nitratabbau nach 24 Stunden dargestellt (Abbildung 4.39).

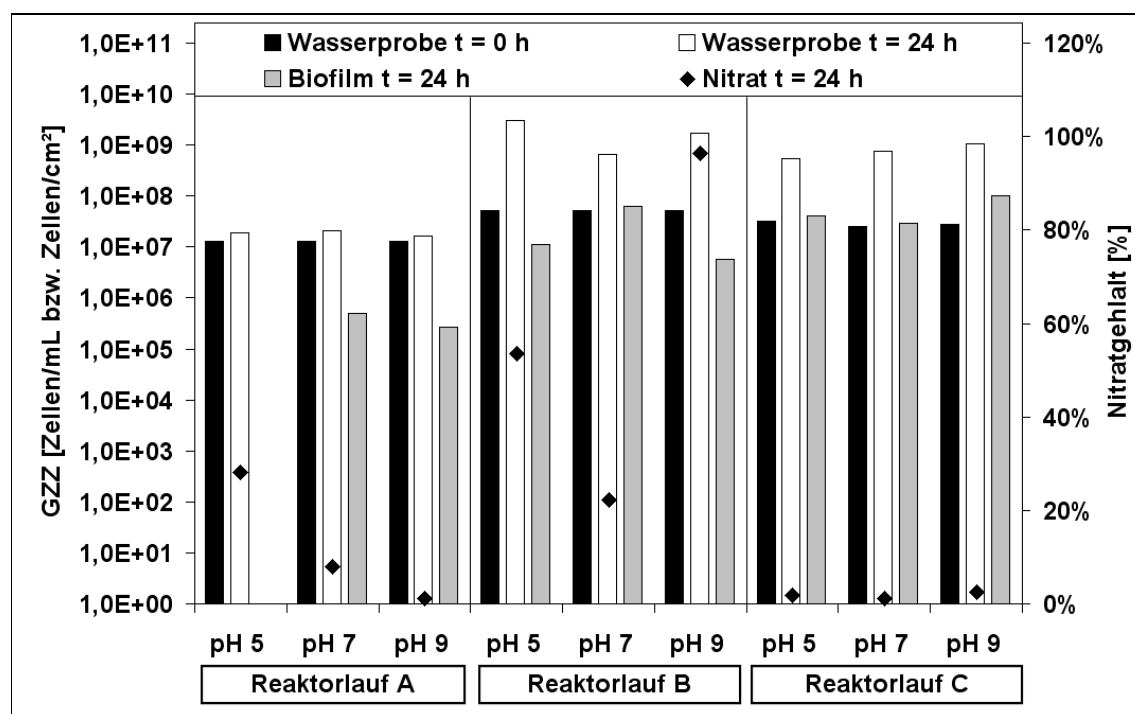


Abbildung 4.39: Gesamtzellzahl in Wasser- und Biofilmproben von drei Reaktorläufen bei pH-Werten pH 5, pH 7 und pH 9 in Bezug zum Nitratgehalt nach 24 h. Startwert Nitrat ca. 310 mg/L Nitrat. Die Reaktortemperatur betrug konstant 40 °C.

In allen drei Versuchsreihen lag die Ausgangssituation im Bezug auf die Gesamtzellzahl in der Wasserphase relativ konstant bei ca. 10<sup>7</sup> Zellen/mL. Nach 24 Stunden Versuchsdauer war in der Wasserphase nur bei Reaktorlauf B und

Reaktorlauf C eine Zunahme der Gesamtzellzahl auf ca.  $10^9$  Zellen/mL erkennbar. Gleiches galt für die Analysenwerte der Gesamtzellzahl im Biofilm nach 24 Stunden.

Nur der Reaktorlauf C zeigte bei alle drei Reaktoren unabhängig vom pH Wert einen guten Nitratabbau auf weniger als 5 % der ursprünglich vorhandenen Nitratkonzentration. Im Falle des Reaktorlaufes A konnte mit zunehmendem pH-Wert ein zunehmender Nitratabbau nach 24 Stunden festgestellt werden. Der Reaktorlauf B wies bei pH 9 keinen Nitratabbau mehr auf, bei pH 5 wurde knapp die Hälfte der Nitratkonzentration abgebaut und bei pH 7 war noch ein Viertel der ursprünglichen Nitratkonzentration nach 24 Stunden nachweisbar gewesen.

Betrachtet man im Vergleich dazu die Zellzahlen für die nitratreduzierenden Bakterien (NRB) und setzt sie in Relation zu dem Nitratgehalt nach 24 Stunden, so stellt man fest, dass genau wie bei der Gesamtzellzahl auch bei der Anzahl der nitratreduzierenden Bakterien zu Beginn der jeweiligen Reaktorläufe, relativ konstante Zellzahlen in der Größenordnung von  $10^5$  MPN/mL Wasserprobe vorhanden waren (Abbildung 4.40).

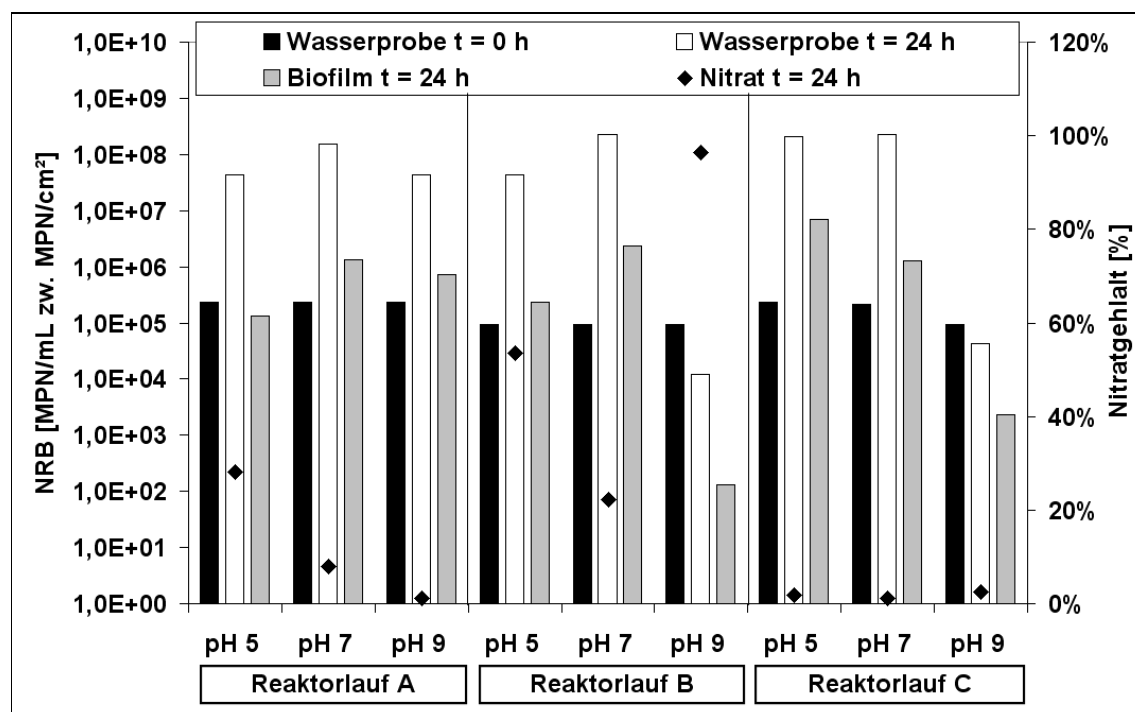


Abbildung 4.40: Anzahl der nitratreduzierenden Bakterien (NRB) in den Wasser- und Biofilmproben von drei Reaktorläufen bei den pH-Werten pH 5, pH 7 und pH 9 in Bezug zum Nitratgehalt nach 24 h. Die Reaktortemperatur betrug konstant 40 °C.

In der Wasserphase hatte nach 24 Stunden eine Anreicherung der NRB um mehr als 2 Zehnerpotenzen stattgefunden. Es gab jedoch zwei Ausnahmen von dieser

Beobachtung und zwar beim pH-Wert von pH 9 in den Reaktorläufen B und C. In beiden Versuchsreihen wurden bei dem Reaktor, der zu Versuchsbeginn auf pH 9 eingestellt worden war, sowohl im Biofilm als auch in der Wasserphase nach 24 Stunden Versuchsdauer deutlich geringere Zellzahlen für nitratreduzierenden Bakterien nachgewiesen. Der Nitratabbau war bei den beiden Reaktoren, die zu Beginn des Versuches auf pH 9 eingestellt worden waren, jedoch sehr unterschiedlich. Während beim Reaktorlauf C das enthaltene Nitrat nahezu vollständig abgebaut wurde, konnte beim Reaktorlauf B fast kein Nitratabbau festgestellt werden, da noch ca. 96 % der ursprünglichen Nitratkonzentration im Reaktor nachweisbar waren.

Anhand Gleichung 10 (Seite 29) ist ersichtlich, dass der mikrobielle Nitratabbau Einfluss auf den pH-Wert nimmt. Die Abbildung 4.41 zeigt den Nitratgehalt nach 24 Stunden in % vom Startwert und korreliert ihn mit dem pH-Wert, der nach 24 Stunden Versuchsdauer im Batch-Reaktor gemessen wurde.

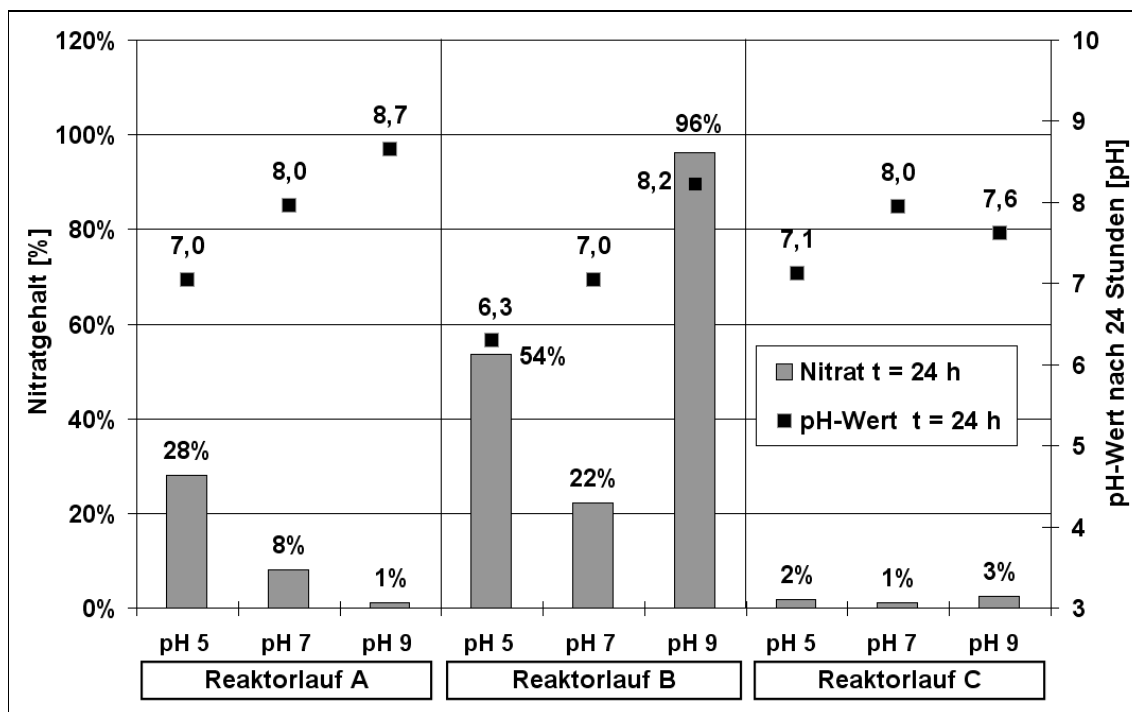


Abbildung 4.41: Nitratgehalt und Entwicklung des pH-Wertes innerhalb von 24 h Versuchsdauer in Abhängigkeit vom pH-Wert bei konstanter Reaktortemperatur von 40 °C.

In allen drei Versuchsreihen nahm der pH-Wert des Reaktors, der zu Beginn auf pH 5 eingestellt war, innerhalb von 24 Stunden um ca. 2 pH-Stufen auf pH 7 zu. Bei den zu Beginn auf pH 7 eingestellten Reaktoren erhöhte sich der pH-Wert im Falle von Reaktorlauf A und C um jeweils eine pH-Stufe, während beim Reaktorlauf B der pH-Wert konstant blieb. Bei den zu Versuchsbeginn auf pH 9 eingestellten Reaktoren

konnte eine leichte Abnahme des pH-Wertes gemessen werden, die aber in allen drei Versuchsreihen unterschiedlich groß ausfiel (0,3 – 1,4 pH-Stufen). Eine Korrelation der pH-Werte nach 24 Stunden Versuchsdauer mit dem Nitratgehalt nach 24 Stunden war nicht möglich.

Im Falle des Reaktorlaufs C wurden in den drei Batch-Reaktoren zusätzlich noch der Sauerstoffgehalt und das Redoxpotential zu Beginn des Versuches bei  $t = 0$  h und nach 24 Stunden Versuchsdauer gemessen (Tabelle 4.12).

Tabelle 4.12: Entwicklung des pH-Wertes, des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotentials innerhalb einer Versuchsdauer von 24 h für die drei Batch-Reaktoren aus Reaktorlauf C mit unterschiedlichen pH-Werten zu Beginn des Versuches (pH 5, pH 7 und pH 9).

Zeit [h]	pH-Wert			Sauerstoffgehalt [mg/L O <sub>2</sub> ]			Redoxpotential [mV]		
	Reak-tor 1	Reak-tor 2	Reak-tor 3	Reak-tor 1	Reak-tor 2	Reak-tor 3	Reak-tor 1	Reak-tor 2	Reak-tor 3
0	5,60	7,02	8,91	6,40	6,15	6,44	+162	+77	+41
24	7,12	7,95	7,62	0,05	0,05	0,05	-196	-269	-202

Bei der Messung des Sauerstoffgehaltes in den Batch-Reaktoren konnte zu Beginn des Reaktorlaufs C in allen drei Reaktoren ein Wert von  $> 6$  mg/L O<sub>2</sub> bestimmt werden. Innerhalb der Versuchsdauer von 24 Stunden sank der Sauerstoffgehalt für alle drei Reaktoren bis auf 0,05 mg/L O<sub>2</sub> ab. Das Redoxpotential lag zu Beginn des Reaktorlaufes mit steigendem pH-Wert bei niedrigeren Redoxpotentialen. Nach einer Versuchsdauer von 24 Stunden wurden im Falle der auf pH 5 und pH 7 eingestellten Reaktoren das gleiche Redoxpotential von ca. -200 mV gemessen und für den pH 7 Reaktor wurden -269 mV ermittelt.

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse für die drei Reaktorläufe beim Nitratabbau und beim pH-Wert am Ende der 24-stündigen Versuchsdauer, wurden analog der vorherigen drei Reaktorläufe, zwei neue Batch-Reaktorläufe mit gepufferten pH-Systemen konzipiert. Zum Einsatz kamen dabei die drei Puffer MES (2-Morpholinoethansulfonsäure) für pH 5, MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure) für pH 7 und TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid) für pH 9. Die Zugabe der drei Puffer erfolgte in einer Konzentration von 0,1 M. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 4.42 dargestellt.

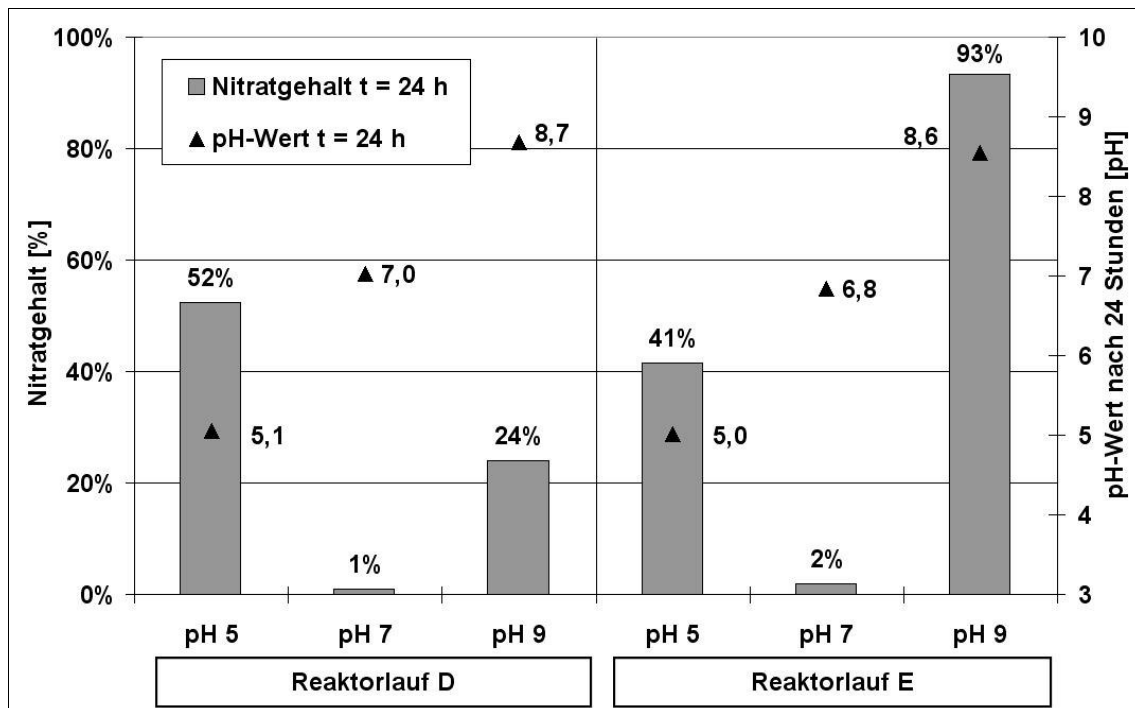


Abbildung 4.42: Nitratgehalt und Entwicklung des pH-Wertes innerhalb von 24 h Versuchsdauer in Abhängigkeit vom pH-Wert bei konstant 40 °C Reaktortemperatur.

Anhand der pH-Werte nach 24 Stunden Versuchsdauer ist erkennbar, dass die pH-Werte der einzelnen Reaktoren durch die drei verwendeten Puffer im jeweiligen Reaktor gut konstant gehalten werden konnten. Der Nitratabbau war in beiden Versuchsreihen bei pH 7 nahezu vollständig. Bei pH 5 war er in beiden Versuchsreihen innerhalb von 24 Stunden nur auf ca. 40 – 50 % des Startwertes vorangeschritten. Bei pH 9 wurde im Reaktorlauf D ein unvollständiger Nitratabbau auf 24 % der ursprünglichen Nitratkonzentration festgestellt. In der zweiten Versuchsreihe dagegen, konnten noch 93 % der ursprünglichen Nitratkonzentration im Reaktor nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass fast kein mikrobieller Nitratabbau stattgefunden hat.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Analysen für die Biofilm- und Wasserproben sind im Folgenden für die Gesamtzellzahl (Abbildung 4.43) und danach für die nitrat-reduzierenden Bakterien (Abbildung 4.44) grafisch dargestellt.

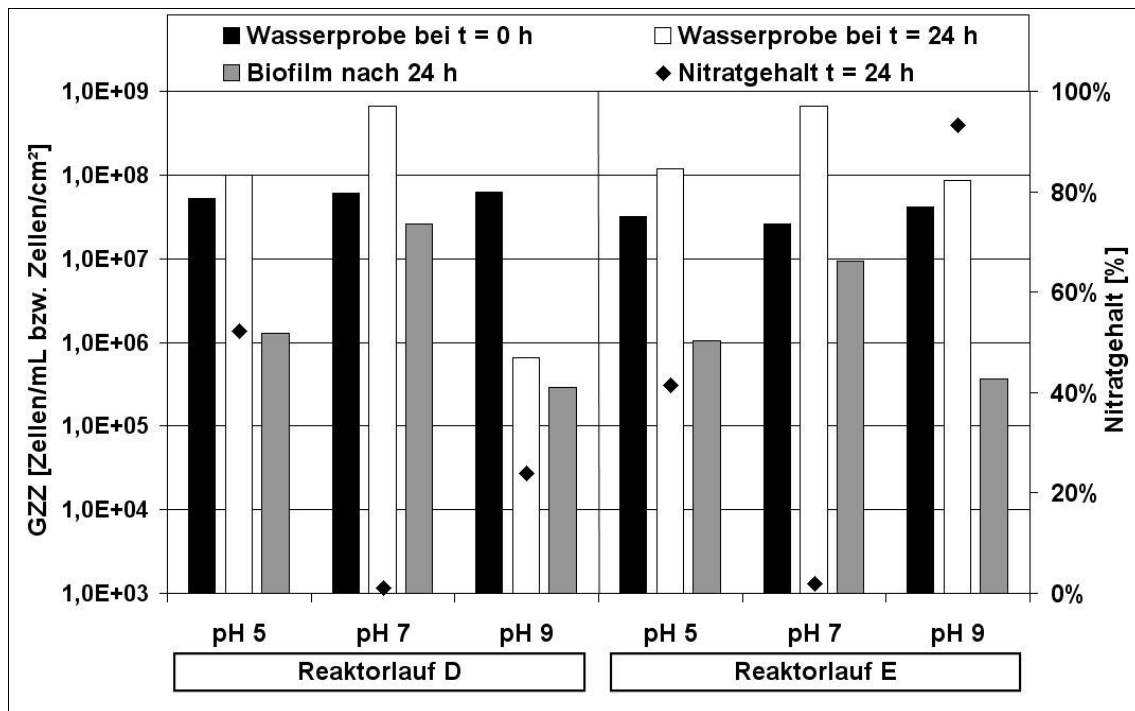


Abbildung 4.43: Gesamtzellzahl (GZZ) in Wasser- und Biofilmp Proben von zwei Reaktorläufen bei gepufferten pH-Werten pH 5, pH 7 und pH 9 in Bezug zum Nitratgehalt nach 24 h. Die Reaktortemperatur betrug konstant 40 °C.

In Abbildung 4.43 ist zu erkennen, dass die Ausgangssituation zu Beginn der beiden Reaktorläufe im Bezug auf die Gesamtzellzahl konstant bei fast  $10^8$  Zellen/mL Wasserprobe lag. Für die Gesamtzellzahl nach 24 Stunden Versuchsdauer konnten sowohl in der Wasserprobe als auch in der Biofilmprobe die höchsten Zellzahlen mit fast  $10^9$  Zellen/mL bzw.  $10^7$  Zellen/cm<sup>2</sup> bei einem pH-Wert von pH 7 nachgewiesen werden. Bei pH 5 und auch bei pH 9 waren die Gesamtzellzahlen in der Wasserprobe und im Biofilm um mindestens eine Logstufe niedriger. In beiden Versuchsreihen korreliert also die höchste Gesamtzellzahlzunahme mit einem nahezu vollständigen Nitratabbau im betreffenden Reaktor.



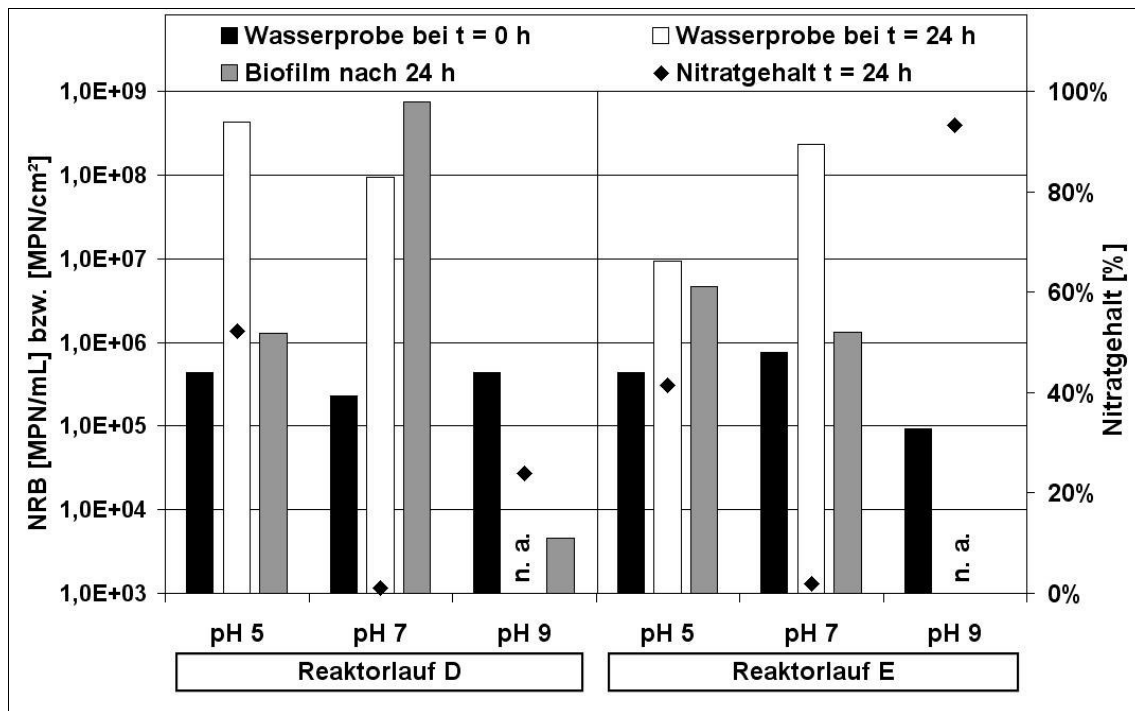


Abbildung 4.44: Anzahl der nitratreduzierenden Bakterien (NRB) in den Wasser- und Biofilmpuben von drei Reaktorläufen bei gepufferten pH-Werten pH 5, pH 7 und pH 9 in Bezug zum Nitratgehalt nach 24 h. Die Reaktortemperatur betrug konstant 40 °C. Die beiden Wasserproben der pH 9 Reaktoren nach 24 h und der Biofilmprobe nach 24 h von Reaktorlauf B konnten nicht ausgewertet werden; n. a., nicht auswertbar.

In Abbildung 4.44 sind analog der Abbildung 4.43 die Ergebnisse für die NRB dargestellt. Genau wie zuvor bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl, wurden auch bei der Bestimmung der nitratreduzierenden Bakterien zu Beginn der beiden Versuchsreihen relativ einheitliche Werte von  $10^5$  bis  $10^6$  MPN/mL Wasserprobe nachgewiesen. Nach 24 Stunden ließen die Werte jedoch keinen einheitlichen Trend mehr erkennen. Bei den Wasserproben wurden nach 24 Stunden Versuchsdauer bei den Reaktoren mit pH 7 und pH 5 eine Erhöhung der Werte um zwei bis drei Zehnerpotenzen auf  $10^8$  MPN/mL Wasserprobe bestimmt.

Auffällig war im Reaktorlauf D mit fast  $10^9$  MPN/cm<sup>2</sup> Couponfläche die hohe Anzahl NRB im Biofilm des Reaktors, der auf pH 7 eingestellt war. Im Falle von Reaktorlauf E konnten im Biofilm des pH 5 und pH 7 Reaktors nur rund  $10^6$  MPN/cm<sup>2</sup> Couponfläche nachgewiesen werden. Die niedrigsten Zellzahlen für nitrat-reduzierende Bakterien im Biofilm wiesen die beiden Reaktoren bei pH 9 auf. Hier konnten nur  $7,1 \times 10^2$  bzw.  $4,6 \times 10^3$  MPN/cm<sup>2</sup> Couponfläche bestimmt werden.

Bei der Bestimmung des Sauerstoffgehaltes wurde zu Beginn der beiden Reaktorläufe relativ konstant 6 mg/L O<sub>2</sub> gemessen (Tabelle 4.13). Innerhalb der 24 stündigen Versuchsdauer nahm der Sauerstoffgehalt in allen Batch-Reaktoren

deutlich ab. Bei den Reaktoren mit einem pH-Wert von pH 7 und pH 9 wurden Werte von 0,05 mg/L O<sub>2</sub> oder kleiner bestimmt. In den beiden Reaktoren, die bei pH 5 betrieben worden waren, wurden höhere Sauerstoffgehalte von 1,1 bzw. 0,4 mg/L O<sub>2</sub> gemessen.

Tabelle 4.13: Entwicklung des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotentials innerhalb einer Versuchsdauer von 24 h für zwei Reaktorläufe mit je drei unterschiedlichen pH-Werten in den Batch-Reaktoren (pH 5, pH 7 und pH 9).

Reaktorlauf	Zeit [h]	Sauerstoffgehalt in mg/L O <sub>2</sub>			Redoxpotential [mV]		
		Reaktor pH 5	Reaktor pH 7	Reaktor pH 9	Reaktor pH 5	Reaktor pH 7	Reaktor pH 9
Reaktorlauf D	0	6,10	6,10	6,10	+196	+119	+13
	24	1,07	0,05	0,05	+150	-277	-263
Reaktorlauf E	0	5,50	6,20	6,10	+147	+95	+9
	24	0,40	0,03	0,03	+176	-370	-283

Aufgrund der pH-Wert-Abhängigkeit des Redoxpotentials wiesen die Batch-Reaktoren zu Beginn der Versuche mit steigendem pH-Wert ein niedrigeres Redoxpotential auf. Innerhalb der Versuchsdauer von 24 Stunden nahm das Redoxpotential in allen Batch-Reaktoren, die bei pH 7 und pH 9 betrieben wurden, auf Werte kleiner als -250 mV ab. Im Falle der beiden Batch-Reaktoren, die auf pH 5 eingestellt waren, zeigte sich analog dem Sauerstoffgehalt, nur eine geringe Veränderung des Redoxpotentials. Im ersten Reaktorlauf nahm das Redoxpotential um 46 mV ab und beim zweiten Reaktorlauf nahm das Redoxpotential um 29 mV leicht zu.

#### 4.6.3 Einfluss des Salzgehaltes auf den Nitratabbau

In industriellen Wasserkreislaufsystemen kann es aufgrund der Wasserrückführung und Zugabe von chemischen Additiven zu deutlichen Anreicherungseffekten kommen, so dass die Salzkonzentration bzw. die Leitfähigkeit deutlich zunimmt. In relativ offenen Wasserkreislaufsystemen betragen typische Werte für die Leitfähigkeit ca. 1,0 mS/cm. In komplett geschlossenen Wasserkreisläufen sind dagegen Werte von 10,0 mS/cm oder höher realistisch. Um den Einfluss des Salzgehaltes auf den Nitratabbau zu untersuchen, wurde eine Versuchsreihe mit drei unterschiedlichen Leitfähigkeiten konzipiert (1,0 mS/cm; 3,0 mS/cm und 10,0 mS/cm), indem drei unterschiedliche Mengen Natriumchlorid (100 mg/L, 750 mg/L und 3500 mg/L) den Reaktoren zugegeben wurden.

In Abbildung 4.45 ist ersichtlich, dass der Salzgehalt bzw. die Chloridkonzentration in diesem Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf den Nitratabbau zu haben scheint. In allen drei Versuchsreaktoren konnten nach 24 Stunden Versuchsdauer weniger als 10 % der ursprünglichen Nitratkonzentration nachgewiesen werden.

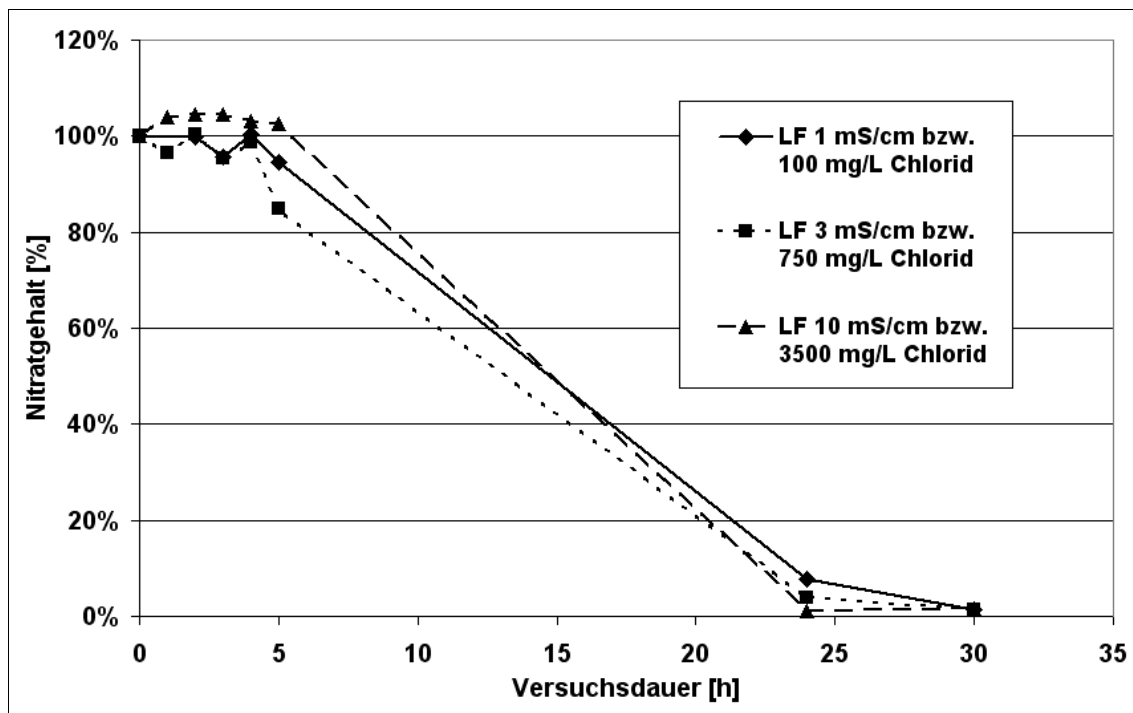


Abbildung 4.45: Zeitlicher Verlauf des Nitratgehaltes während 30 h Inkubation in drei Reaktoren mit unterschiedlicher Leitfähigkeit bzw. Chloridgehalt bei konstant 40 °C Reaktortemperatur und einem anfänglichen pH-Wert von pH 7.

Genau wie beim Nitratgehalt, wurden auch beim pH-Wert und beim Sauerstoffgehalt innerhalb der ersten 5 Stunden Versuchsdauer keine Veränderungen festgestellt. Nach 24 Stunden war der pH-Wert um eine pH-Stufe von 7,3 bis auf 8,3 gestiegen (Tabelle 4.14). Der Sauerstoffgehalt nahm im gleichen Zeitraum von anfangs > 3,2 mg/L O<sub>2</sub> auf < 0,05 mg/L O<sub>2</sub> in allen drei Batch-Reaktoren ab. Von der 24. Stunde bis zur 30. Stunde stieg der pH-Wert allerdings nicht weiter an, sondern im Gegenteil, er sank innerhalb dieser 6 Stunden wieder um eine halbe pH-Einheit auf ca. pH 7,8 ab.

Tabelle 4.14: Entwicklung des pH-Wertes und des Sauerstoffgehaltes in drei Batch-Reaktoren mit unterschiedlichem Salzgehalt in Abhängigkeit von der Versuchsdauer.

Parameter	pH-Wert			Sauerstoffgehalt in mg/L O <sub>2</sub>		
	Reaktor LF 1	Reaktor LF 3	Reaktor LF 10	Reaktor LF 1	Reaktor LF 3	Reaktor LF 10
Zeit [h]						
0	7,32	7,29	7,20	3,20	3,50	3,36
5	7,32	7,15	7,16	3,24	3,20	3,15
24	8,33	8,41	8,14	0,02	0,02	0,02
30	7,81	7,82	7,73	0,03	0,03	0,03

Betrachtet man die Ergebnisse der mikrobiologischen Analysen der Wasserproben aus den Reaktorläufen (Abbildung 4.46), so lassen sich auch hier keine deutlichen Unterschiede bei der Gesamtzellzahl oder der Anzahl der NRB in den Wasserproben bei den drei unterschiedlichen Salzkonzentrationen feststellen.

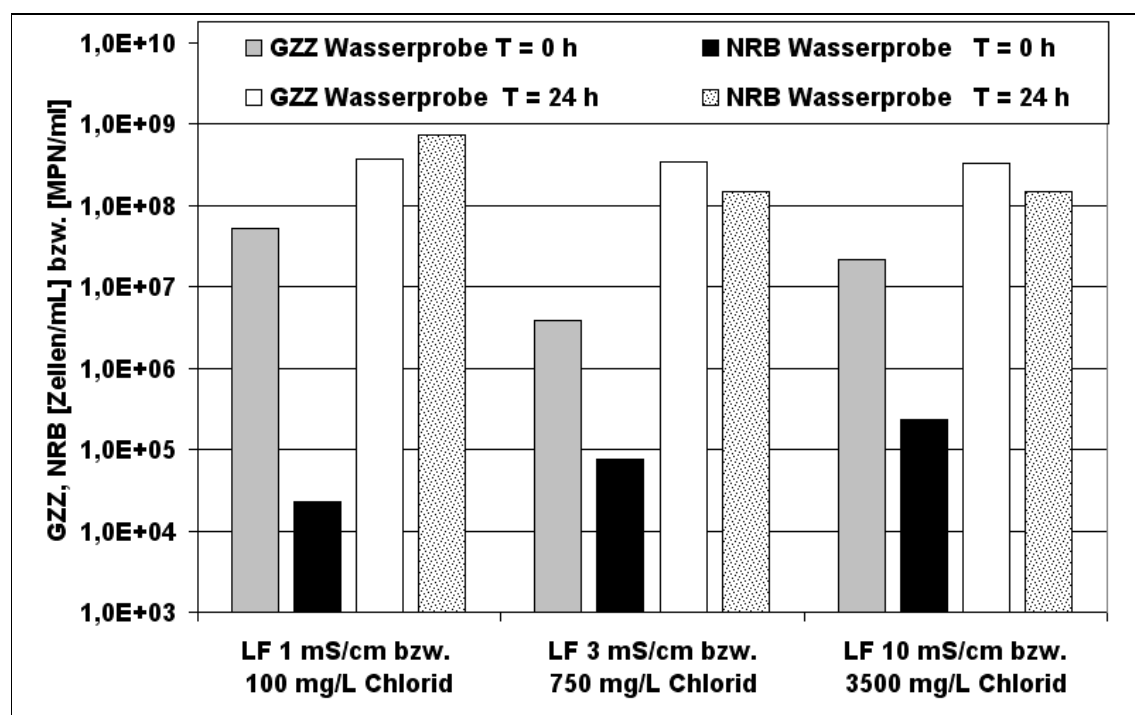


Abbildung 4.46: Analyse von Wasserproben auf Gesamtzellzahl und Nitratreduzierern in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit bzw. dem Salzgehalt. Die Reaktoren hatten eine konstante Temperatur von 40 °C und wurden bei einem pH-Wert von pH 7 gestartet.

Zu Beginn des Reaktorversuches waren in den Wasserproben ähnliche Zellzahlen für die GZZ ( $10^6 - 10^7$  Zellen/mL) und die nitratreduzierenden Bakterien ( $10^4 - 10^5$  MPN/mL) vorhanden. Nach 24 Stunden Inkubation im Reaktor hatten sich

sowohl die GZZ als auch die Anzahl der nitratreduzierenden Bakterien bei drei unterschiedlichen Salzkonzentrationen relativ gleichmäßig auf ca.  $5 \times 10^8$  Zellen/mL bzw. MPN/mL erhöht.

Die Auswertung der Ergebnisse der mikrobiologischen Analysen der Biofilmpuben nach 24 Stunden Inkubation bei drei verschiedenen Leitfähigkeiten bzw. Salzgehalten im Batch-Reaktor ergab ähnliche Werte sowohl für die GZZ als auch die NRB (Abbildung 4.47).

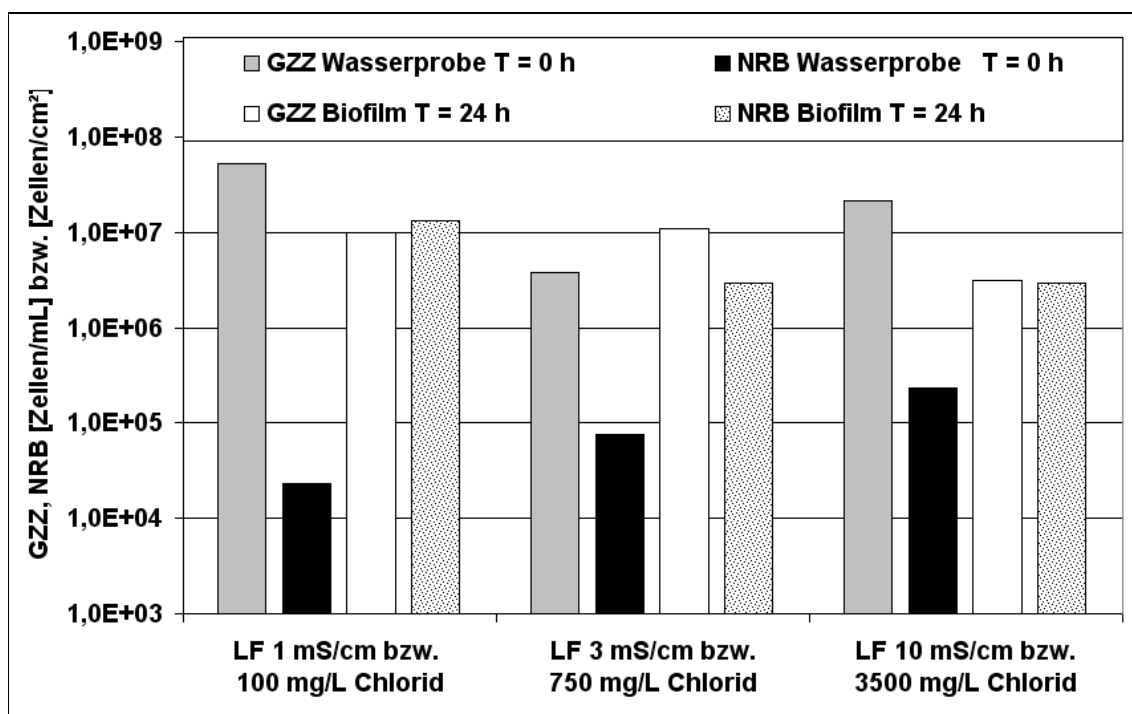


Abbildung 4.47: Analyse von Wasser- und Biofilmpuben auf Gesamtzellzahl und Nitratreduzierern in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit bzw. dem Salzgehalt. Die Reaktoren hatten eine konstante Temperatur von 40 °C und wurden bei einem pH-Wert von pH 7 gestartet.

Sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Anzahl der nitratreduzierenden Bakterien lagen im Biofilm nach 24 Stunden mit  $3 \times 10^6$  MPN/cm<sup>-2</sup> bis  $1 \times 10^7$  Zellen/cm<sup>-2</sup> Couponfläche in der gleichen Größenordnung. Damit konnten keine Unterschiede zwischen den drei Batch-Reaktoren mit unterschiedlicher Leitfähigkeit bzw. unterschiedlicher Salzkonzentration festgestellt werden.

#### 4.6.4 Einfluss des Nitratgehaltes auf den Nitratabbau

Wie schon anhand der Ergebnisse aus den Vorversuchen in Kapitel 4.6 erkennbar, ist der Nitratgehalt in einem Wassersystem für den mikrobiellen Nitratabbau von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene Batch-Reaktor-Versuchsreihen zum Nitratgehalt durchgeführt. Bei der ersten Versuchsreihe wurde eine in der Praxis übliche Dosiermenge von 300 ppm ANS zum Reaktor dosiert und mit einem Reaktor ohne Dosierung von ANS verglichen (Abbildung 4.48). Im Fall der zweiten Versuchsreihe wurde dem jeweiligen Reaktor eine niedrige (100ppm), eine mittlere (200ppm) und eine hohe Dosiermenge ANS (900ppm) zugegeben.

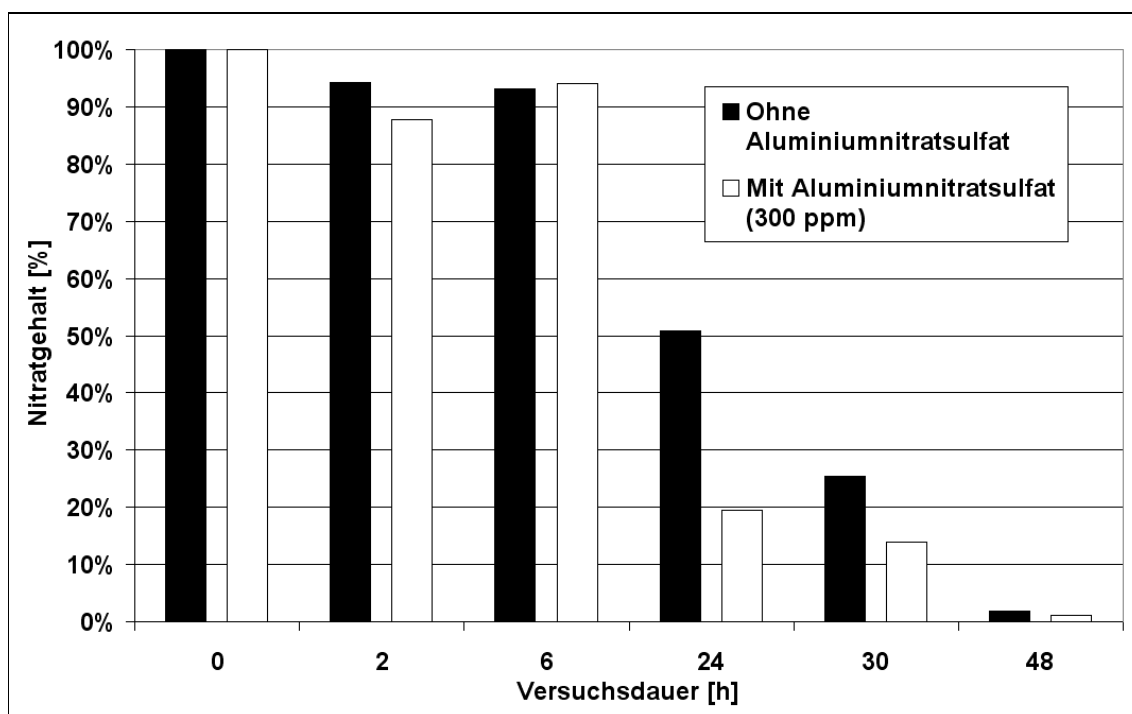


Abbildung 4.48: Entwicklung des Nitratgehaltes in % vom Startwert innerhalb von 48 h mit 300 ppm ANS bzw. ohne Dosierung von ANS bei konstant 40 °C Reaktortemperatur.

In den ersten sechs Stunden nach Dosierung von in der Praxis üblichen 300 ppm ANS im Vergleich zu einem Batch-Reaktor ohne Dosierung von ANS zeigten sich kaum Unterschiede beim Nitratabbau. Nach 24 Stunden waren allerdings im Reaktor ohne zusätzliche Dosierung von ANS 49 % des ursprünglich vorhandenen Nitratgehaltes abgebaut, während im Reaktor mit Dosierung von 300 ppm ANS schon 81 % Nitrat abgebaut worden waren. Nach 48 Stunden Versuchsdauer war das enthaltene Nitrat in beiden Reaktoren nahezu vollständig abgebaut worden und nur noch 1 % bzw. 2 % konnten in den beiden Reaktoren nachgewiesen werden.

Die pH-Werte in dieser Versuchsreihe lagen zu Beginn beim Reaktor ohne Dosierung von ANS bei pH 7,27 und beim Reaktor mit Dosierung von 300 mg/L des sauren ANS bei einem etwas niedrigeren pH-Wert von pH 6,68. Nach 24 Stunden Inkubation lag der pH-Wert beim unbehandelten Reaktor bei pH 7,02 und beim Reaktor mit Dosierung von ANS bei einem pH-Wert von pH 7,22 (Tabelle 4.15).

Tabelle 4.15: Entwicklung des pH-Wertes, des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotentials in zwei Batch-Reaktoren mit bzw. ohne Dosierung von ANS innerhalb einer Versuchsdauer von 24 h.

Parameter	pH-Wert		Sauerstoffgehalt [mg/L O <sub>2</sub> ]		Redoxpotential [mV]	
	Reaktor ohne ANS	Reaktor mit ANS	Reaktor ohne ANS	Reaktor mit ANS	Reaktor ohne ANS	Reaktor mit ANS
Zeit						
0	7,27	6,68	3,15	2,80	+143	+180
24	7,02	7,22	0,02	0,02	-6	-6

Der Sauerstoffgehalt war in beiden Reaktoren von anfangs ca. 3 mg/L O<sub>2</sub> innerhalb von 24 Stunden auf 0,02 mg/L O<sub>2</sub> abgesunken. Das Redoxpotential betrug zu Beginn des Reaktorlaufes mit Dosierung von ANS +180 mV und im Reaktor ohne Dosierung von ANS +143 mV. Nach 24 Stunden Versuchsdauer wurde in beiden Reaktoren der gleiche Wert von -6 mV bestimmt.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Analysen der Wasser- und Biofilmproben für die Gesamtzellzahl-Bestimmung (Abbildungen 4.49) und die Anzahl der nitrat-reduzierenden Bakterien (Abbildungen 4.50) sind im Folgenden dargestellt.

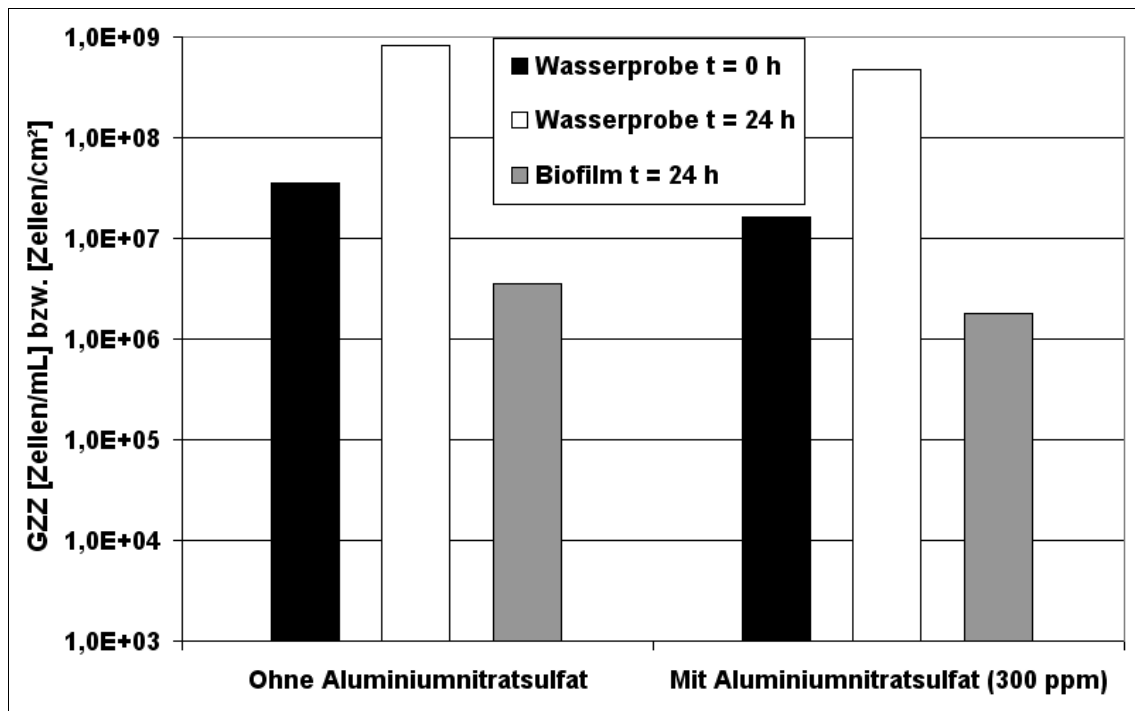


Abbildung 4.49: Entwicklung der Gesamtzellzahl in Wasser- und Biofilmproben mit bzw. ohne Dosierung von 300 ppm ANS bei konstant 40 °C Reaktortemperatur.

Bei der Entwicklung der Gesamtzellzahl innerhalb von 24 Stunden für Wasser- und Biofilmproben erkennt man kaum Unterschiede für die beiden Reaktoren mit bzw. ohne Dosierung von 300 ppm ANS. In den Wasserproben wurden nach 24 Stunden jeweils ca.  $9 \times 10^8$  Zellen/mL und im Biofilm nach 24 Stunden ca.  $2 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> nachgewiesen.



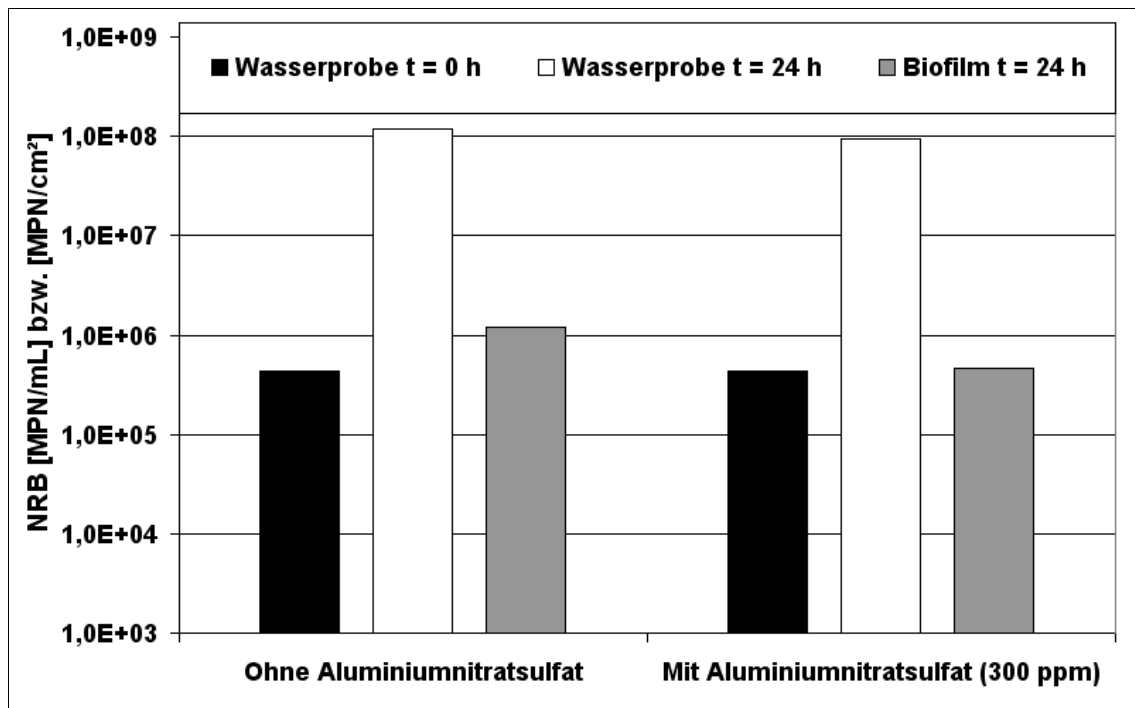


Abbildung 4.50: Entwicklung der nitratreduzierenden Bakterien (NRB) in Wasser- und Biofilmproben mit bzw. ohne Dosierung von 300 ppm ANS bei konstant 40 °C Reaktortemperatur.

Zwischen dem Reaktor mit Dosierung und dem Reaktor ohne Dosierung von 300 ppm ANS konnten auch im Hinblick auf NRB in der Wasserprobe und in der Biofilmprobe keine Unterschiede festgestellt werden. In beiden Reaktoren wurde ein Wachstum der nitratreduzierenden Mikroorganismen in der wässrigen Phase nach 24 Stunden Versuchsdauer um mehr als zwei Logstufen beobachtet und NRB in einer Größenordnung von ca.  $10^8$  MPN/mL Wasserprobe nachgewiesen. In den Biofilmproben aus beiden Reaktoren konnten NRB nach 24 Stunden Versuchsdauer mit ca.  $10^6$  MPN/cm<sup>2</sup> bestimmt werden.

In einer zweiten Versuchsreihe mit Batch-Reaktoren wurden drei unterschiedliche Mengen ANS (100 ppm, 200 ppm, 900 ppm) dem Batch-Reaktor zugegeben. Der Verlauf der Nitratkonzentration innerhalb der ersten 24 Stunden ist in Abbildung 4.51 grafisch dargestellt. Zusätzlich sind noch die pH-Werte zu Beginn des Versuches und nach 24 Stunden Versuchsdauer mit aufgeführt.

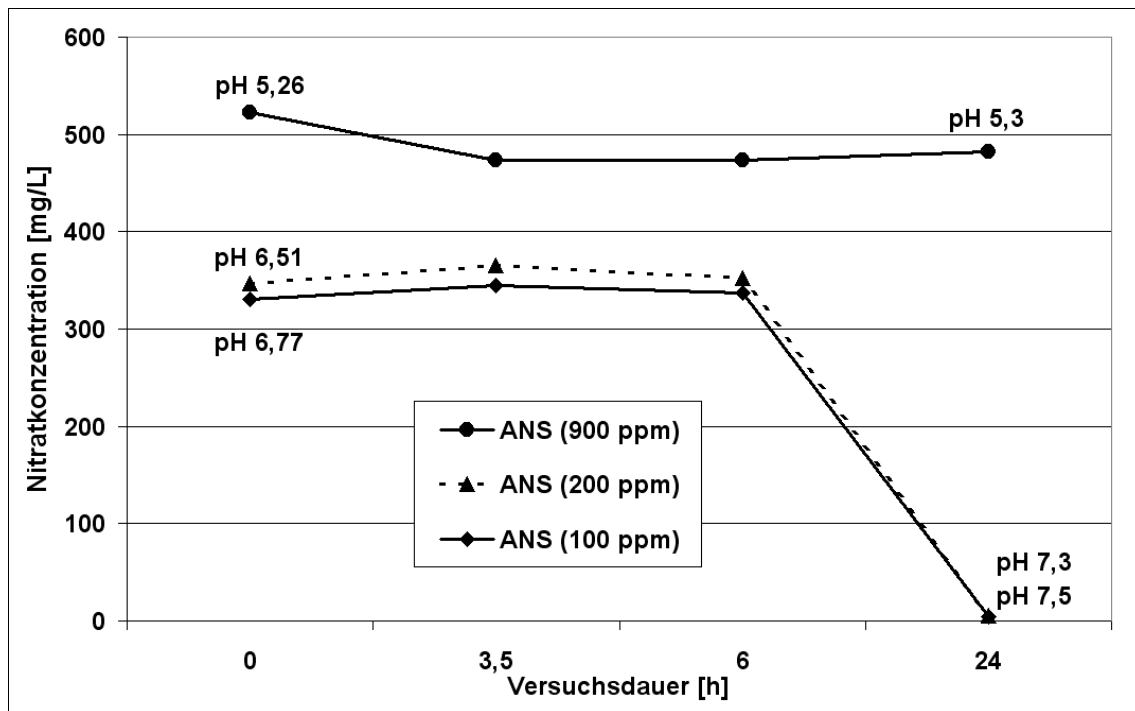


Abbildung 4.51: Verlauf der Nitratkonzentration innerhalb von 24 h in Abhängigkeit von der Zugabe ANS. Die pH-Werte zu Beginn des Versuches und nach 24 h Versuchsdauer sind an den Datenpunkten angegeben. Die Temperatur betrug in allen Reaktoren konstant 40 °C.

Erkennbar ist, dass die Dosierung von 100 ppm bzw. 200 ppm einen sehr ähnlichen Verlauf bei den Nitratgehalten aufwies und der Nitratgehalt nach 24 Stunden Versuchsdauer auf Werte < 5 mg/L Nitrat gesunken war. Auch die pH-Werte der beiden Reaktoren nach 24 Stunden Versuchsdauer lagen relativ dicht beieinander (pH 7,3 bzw. pH 7,5) und variierten nur um 0,2 pH-Einheiten. Im Gegensatz dazu zeigte der Ansatz mit der Dosiermenge von 900 ppm ANS nur eine geringe Veränderung beim Nitratgehalt, die sich auf die ersten dreieinhalb Stunden beschränkte. Danach blieb der Nitratgehalt bis zum Abbruch des Versuches nach 24 Stunden konstant auf gleichem Niveau. Der pH-Wert im Reaktor mit 900 ppm ANS betrug zu Beginn des Versuches pH 5,3 und blieb während der gesamten Dauer des Versuches unverändert.

Die mikrobiologischen Analysenergebnisse für den Reaktorversuch mit drei unterschiedlichen Dosiermengen ANS sind beginnend mit der Bestimmung der Gesamtzellzahl für Wasser- und Biofilmpuben aufgeführt (Abbildung 4.52).

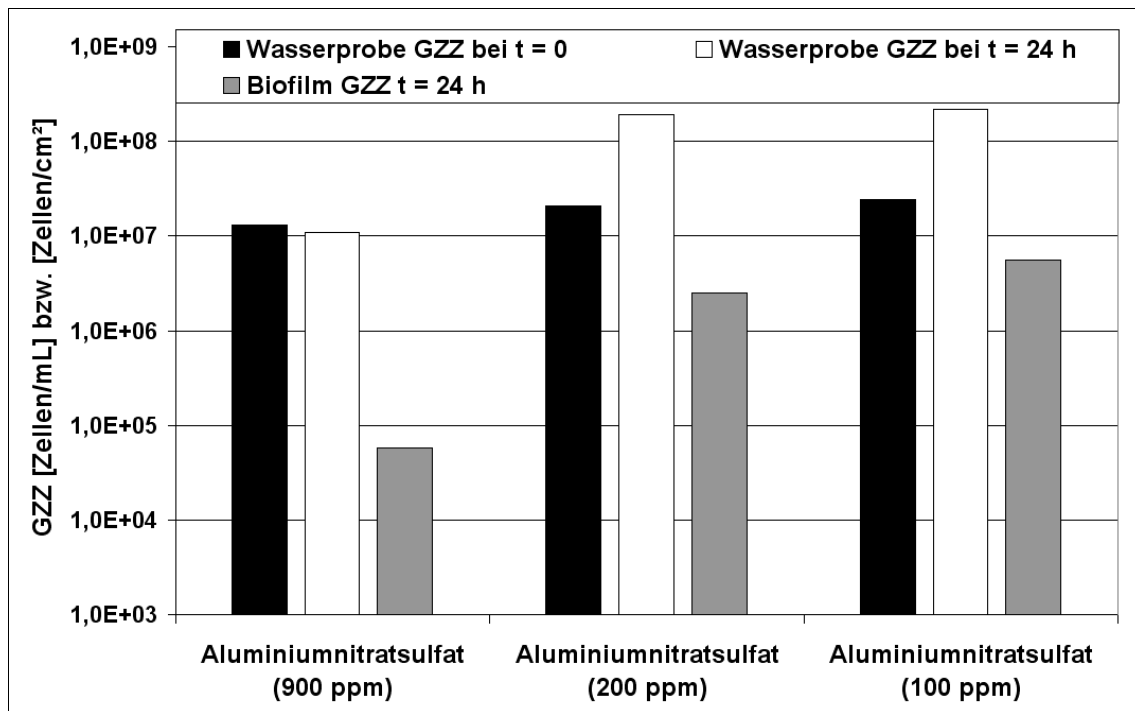


Abbildung 4.52: Entwicklung der Gesamtzellzahl in Wasser- und Biofilmpuben für Batch-Reaktoren mit drei unterschiedlichen Dosiermengen ANS. Die Temperatur in den Reaktoren betrug konstant 40 °C.

Die beiden Reaktoren mit Dosiermengen von 100 ppm bzw. 200 ppm ANS wiesen ähnliche Werte bei allen untersuchten Parametern auf. Bei der Dosierung von 900 ppm dagegen, entsprachen nur die Werte zu Beginn des Versuches den anderen beiden Reaktoren mit niedrigerer Dosiermenge. Die Gesamtzellzahlen für die Biofilm- und die Wasserprobe nach 24 Stunden bei einer Dosierung von 900 ppm ANS waren dagegen deutlich niedriger. Dies traf insbesondere auf die Gesamtzellzahl im Biofilm nach 24 Stunden zu, sie lag um zwei Zehnerpotenzen unter den Werten der anderen beiden Reaktoren.

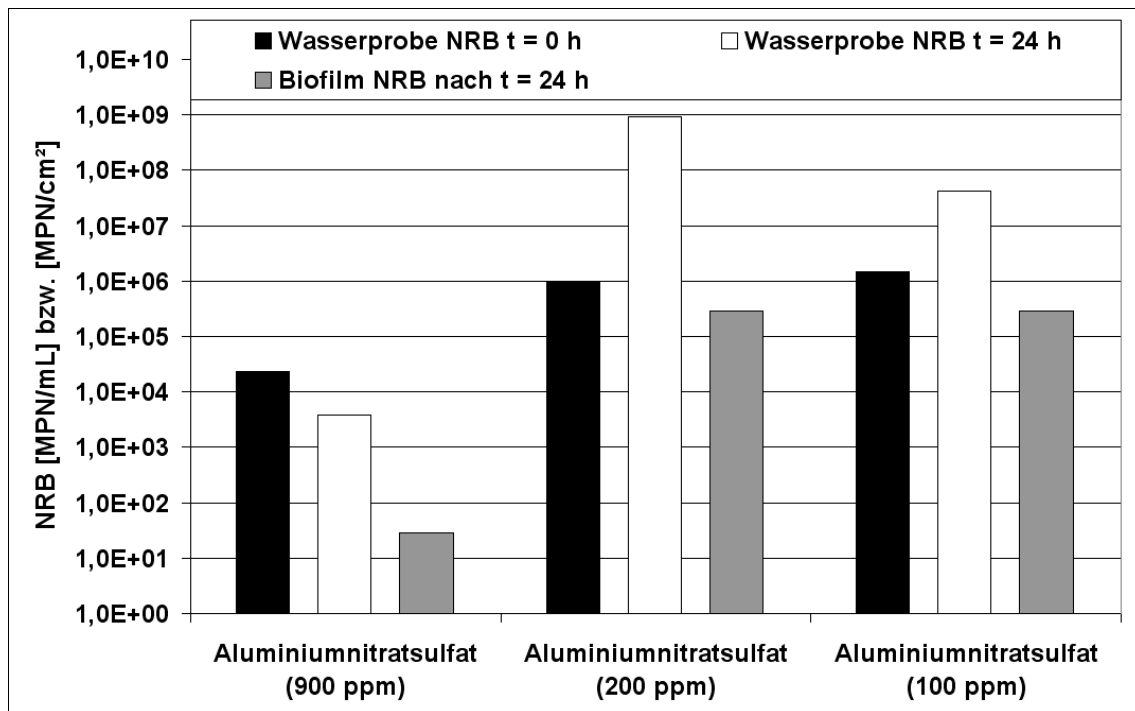


Abbildung 4.53: Entwicklung der nitratreduzierenden Bakterien (NRB) in Wasser- und Biofilmpuben für Batch-Reaktoren mit drei unterschiedlichen Dosiermengen ANS. Die Temperatur in den Reaktoren betrug konstant 40 °C.

Im Gegensatz zu vorangegangenen Versuchen, waren die nitratreduzierenden Bakterien zu Beginn dieses Versuches nicht in gleicher Größenordnung vorhanden (Abbildung 4.53). Bei dem Reaktor mit hoher Dosierung (900 ppm ANS) betrug sie  $2 \times 10^4$  MPN/mL Wasserprobe, während in den beiden anderen Reaktoren mit ca.  $10^6$  MPN/mL um fast zwei Logstufen mehr NRB in der Wasserprobe nachgewiesen wurden. Nach 24 Stunden Versuchsdauer hatte die Anzahl NRB in der Wasserprobe noch weiter auf  $4 \times 10^3$  MPN/mL abgenommen. Besonders niedrig lag die Zahl der NRB im Biofilm bei dem Reaktor mit der hohen Dosierung von 900 ppm ANS, hier konnten nur insgesamt 29 MPN/cm<sup>2</sup> Couponfläche bestimmt werden.

Für die beiden Reaktoren mit 100 ppm bzw. 200 ppm Dosiermenge ANS wurden annähernd gleiche Werte ( $3 \times 10^5$  MPN/cm<sup>2</sup>) für die Biofilmpuben bestimmt. Im Falle der Wasserproben nach 24 Stunden wurde jedoch für den Batch-Reaktor mit 200 ppm ANS  $10^9$  MPN/mL und für den Batch-Reaktor mit 100 ppm ANS um 1,5 Logstufen weniger NRB mit ca.  $5 \times 10^7$  MPN/mL nachgewiesen.

#### 4.6.5 Einfluss der Nitratquelle auf den Nitratabbau

Durch die Zugabe von ANS wird nicht nur der Nitratgehalt in einem Wasserkreislaufsystem verändert, sondern es soll durch die Aluminiumsalzlösung auch ein bestimmter Effekt im Wassersystem erzielt werden, wie z. B. die Koagulation von kolloidalen Trübstoffen (Kapitel 1.2 und 1.4).

Aus diesem Grund wurden zwei identische Reaktorläufe A und B mit jeweils drei unterschiedlichen Nitratsalzen durchgeführt, um so den Einfluss der Nitratquelle untersuchen zu können. Neben ANS kamen dabei zum einen Natriumnitrat und zum anderen Calciumnitrat zum Einsatz. Die Zugabemengen der Nitratsalze wurden dabei so berechnet, dass zu Beginn des Versuches in allen drei Reaktoren die gleiche Nitratkonzentration von 450 mg/L Nitrat vorhanden war (Abbildung 4.54).

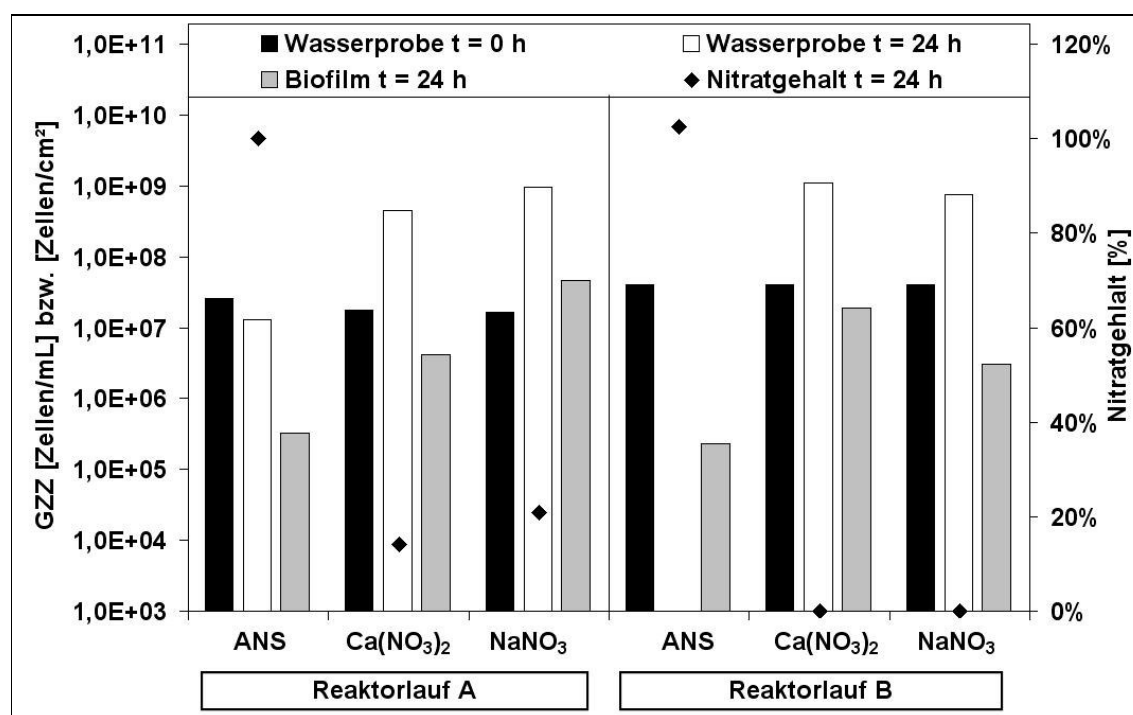


Abbildung 4.54: Gesamtzellzahl (GZZ) in Wasser- und Biofilmpuben von zwei Reaktorläufen bei Dosierung drei verschiedener Nitratquellen in Bezug zum Nitratabbau nach 24 h. Die Temperatur in den Reaktoren betrug konstant 40 °C. Die Wasserprobe nach 24 h konnte im Reaktorlauf B nach Dosierung von ANS nicht ausgewertet werden.

Innerhalb von 24 nach Dosierung von ANS als Nitratquelle war der Nitratgehalt in den beiden Reaktorläufen unverändert geblieben, während der Nitratgehalt bei Dosierung von Natrium- oder Calciumnitrat im Reaktorlauf A auf unter 20 % der ursprünglichen Konzentration gesunken war und im zweiten Reaktorlauf auf < 1 % abgenommen hatte. Analysen nach 30 Stunden Versuchsdauer ergaben im Falle der mit Calcium- bzw. Natriumnitrat dotierten Reaktoren Nitratgehalte < 1 % der

Ausgangskonzentration und beim Reaktor, dem ANS zugegeben worden war, ca. 10 % der Ausgangskonzentration an Nitrat.

Die Ergebnisse der Gesamtzellzahlbestimmung wiesen zu Beginn der beiden Versuchsreihen jeweils ähnliche Werte in allen Reaktoren von ca.  $5 \times 10^7$  Zellen/mL. Nach 24 Stunden Inkubation wurden für die beiden Reaktoren mit Dosierung von ANS allerdings Zellzahlen in der Wasserprobe und im Biofilm bestimmt, die um eine bis zwei Zehnerpotenzen niedriger waren, als dies bei Dosierung von Calcium- oder Natriumnitrat der Fall war.

Genau wie bei der Gesamtzellzahl wurden auch bei den NRB im Falle der hohen Dosierung von ANS deutlich niedrigere Werte erhalten (Abbildung 4.55). Die Anzahl der NRB im Biofilm nach 24 Stunden lag nur bei  $10^2$  bis  $10^3$  MPN/cm<sup>2</sup> Couponfläche, während sie im Falle der Dosierung von Natrium- oder Calciumnitrat zwei bis drei Zehnerpotenzen höher lagen.

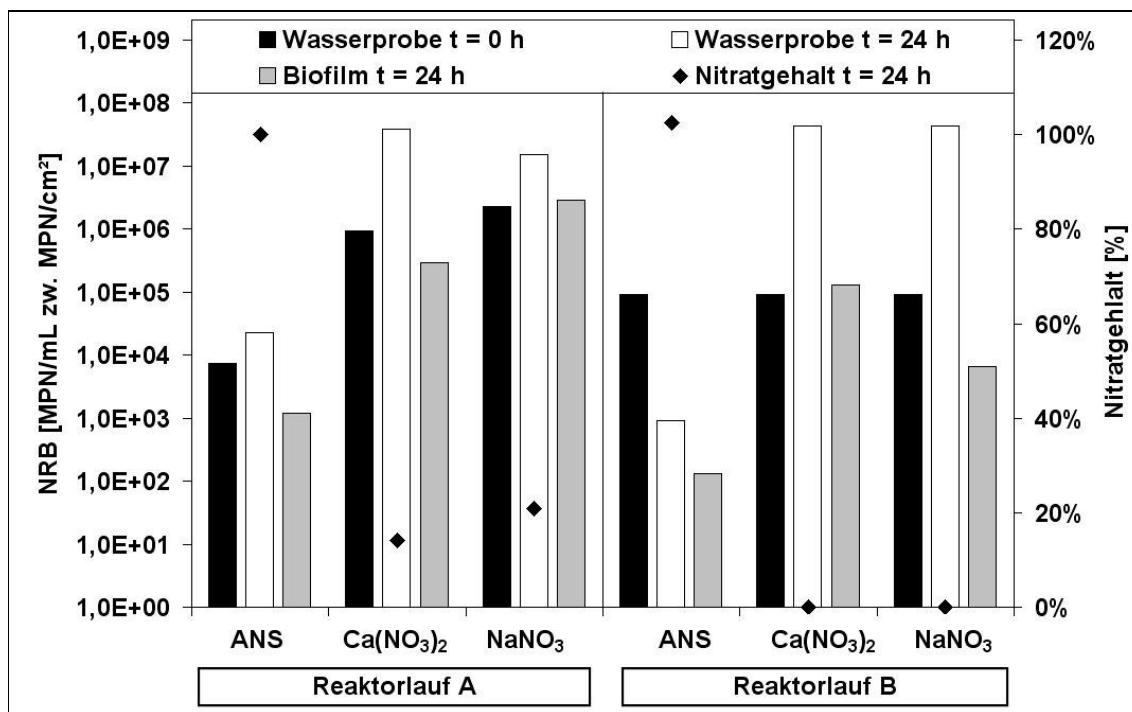


Abbildung 4.55: Anzahl der nitratreduzierenden Bakterien (NRB) in Wasser- und Biofilmproben von zwei Reaktorläufen bei Dosierung drei verschiedener Nitratquellen in Bezug zum Nitratabbau nach 24 h. Die Temperatur in den Reaktoren betrug konstant 40 °C.

Die gleiche Beobachtung konnte bei der Analyse der Wasserproben nach 24 Stunden gemacht werden. Während bei den Reaktoren die ANS zudosiert bekommen hatten, nur  $10^3$  bis  $10^4$  MPN/mL nachgewiesen wurden, konnten in den Wasserproben der Reaktoren, die Natrium- bzw. Calciumnitrat zudosiert bekommen

hatten, NRB in der Größenordnung von  $10^7$  bis  $10^8$  MPN/mL bestimmt werden. Dies entspricht einem Unterschied von vier Logstufen bei der Zahl der NRB in der Wasserphase, je nachdem welche Nitratquelle eingesetzt worden war.

Die Ergebnisse der pH-Wert-Bestimmung ließen in zwei unabhängigen Reaktorläufen für die Batch-Reaktoren mit Zugabe von Calcium- und Natriumnitrat einen deutlichen pH-Anstieg um 1,5 bis 2 pH-Stufen erkennen (Tabelle 4.16). Bei den beiden Reaktoren mit Zugabe von ANS wurden deutlich niedrigere pH-Werte zu Beginn des Versuches von pH 5,1 bis pH 5,3 gemessen. Dieser pH-Effekt dürfte durch die Zugabe des sauren Aluminiumsalzes zu erklären sein.

Tabelle 4.16: Entwicklung des pH-Wertes, des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotentials innerhalb einer Versuchsdauer von 24 h für zwei Reaktorläufe mit jeweils drei verschiedenen Nitratquellen.

Lauf	Zeit [h]	pH-Wert			Sauerstoffgehalt in mg/L O <sub>2</sub>			Redoxpotential [mV]		
		ANS	CaNO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>	ANS	CaNO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>	ANS	CaNO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>
A	0	5,32	6,89	7,13	3,32	3,33	3,52	+243	+182	+192
	24	5,30	8,76	8,68	3,44	0,02	0,05	+210	-196	-174
B	0	5,13	6,73	7,00	6,80	6,86	6,87	+181	+107	+116
	24	5,17	8,18	8,16	6,24	0,04	0,04	+183	-232	-196

Die Sauerstoffgehalte der beiden Reaktorläufe waren jeweils zu Beginn der Versuche in einer ähnlichen Größenordnung. Das Niveau der ersten Versuchsreihe lag bei ca. 3,5 mg/L O<sub>2</sub>, während die zweite Versuchsreihe ein deutlich höheres Niveau von 6,8 mg/L O<sub>2</sub> aufwies. In den beiden Reaktoren mit Zugabe von Calcium- und Natriumnitrat sank der Sauerstoffgehalt innerhalb der Versuchsdauer von 24 Stunden auf Werte < 0,1 mg/L O<sub>2</sub>, während er in den beiden Reaktoren mit Zugabe von ANS nur eine geringe Veränderung zeigte.

Zu Beginn der beiden Versuchsreihen wurden für alle Batch-Reaktoren positive Redoxpotentiale bestimmt. Bei der ersten Versuchsreihe lagen die Werte für die beiden Reaktoren mit Zugabe von Calcium- und Natriumnitrat bei ca. +185 mV und im Falle des Reaktor mit Zugabe von ANS etwas höher bei +243 mV. In der zweiten Versuchsreihe wurden generell für alle drei Reaktoren ca. 70 mV niedrigere Redoxpotentiale bestimmt. Nach 24 Stunden Versuchsdauer wurden für die beiden Reaktoren mit Zugabe von Calcium- und Natriumnitrat in beiden Reaktorläufen negative Werte von ungefähr -200mV gemessen, während der Reaktor mit Zugabe von ANS im ersten Reaktorlauf nur eine geringfügige Abnahme des Redoxpotentials

um 30 mV auf +210 mV zeigte und in der zweiten Reaktorlauf sogar keine Veränderung aufwies.

#### **4.7 Charakterisierung der beteiligten Mikroorganismen**

Zur Identifizierung der beteiligten Bakterien wurden in ausgewählten Reaktorläufen exemplarisch Untersuchungen durchgeführt. Die Proben dazu stammten von Biofilm- und Wasserproben aus den Reaktoren zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf den Nitratabbau (Kap. 4.6.1) und aus Reaktoren mit bzw. ohne Dosierung von Aluminiumnitratsulfat (Kap. 4.6.4). Das Inokulum der ausgewählten Batch-Reaktoren stammte in allen Fällen aus der Papierfabrik 1.

Für die Analysen wurde je ein MPN-Röhrchen aus der MPN-Verdünnungsreihe für nitratreduzierende Bakterien ausgewählt, ein Aliquot entnommen und Einzelkolonieausstriche auf Nitrat-Agar angelegt. Die Bebrütung erfolgte bei 36 °C für 24 Stunden. Alle unterschiedlichen Kolonietypen wurden auf Nitrat-Agar überimpft, um Reinkulturen zu gewinnen. Die erhaltenen Reinkulturen wurden im Anschluss mit dem API bzw. Biolog-System identifiziert (Kap. 3.4.5). Die Ergebnisse der Identifizierung sind in Tabelle 4.17 dargestellt.

Viele Gram-negative Isolate konnten bis zur Gattung bzw. Art identifiziert werden. Die meisten der identifizierten Arten sind gemäß der angegebenen Literatur in der Lage, Nitrat zu reduzieren (Tabelle 4.17).

Bei den Analysen der Reaktoren mit und ohne Zugabe von ANS wurden ähnliche viele Gram-negative wie Gram-positive Isolate erhalten. Bei den Gram-positiven Mikroorganismen handelte es sich hauptsächlich um große stäbchenförmige Bakterien. Einige Isolate wurden der Gattung *Bacillus* zugehörig identifiziert (Tabelle 4.17).



Tabelle 4.17: Identifizierungen von Mikroorganismen aus MPN-Ansätzen mit Nitratbouillon.

Herkunft	Identifizierung	Nitrat-Reduktion	Literatur
Reaktor 40 °C, wässrige Phase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	(Kerschen et al., 2001)
Reaktorlauf A	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	
Reaktor 40 °C, Biofilm	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,	+	(Kerschen et al., 2001)
Reaktorlauf A	<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>	-	
	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	
Reaktor 20 °C, wässrige Phase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	(Kerschen et al., 2001)
Reaktorlauf B			
Reaktor 20 °C, Biofilm	<i>Chryseomonas luteola</i>	+	(Gillis und Logan, 2005)
Reaktorlauf B			
Reaktor 40 °C, Biofilm	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	(Kerschen et al., 2001)
Reaktorlauf B			
Mit ANS; Biofilm	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	(Brenner und Farmer, 2005)
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	(Brenner und Farmer, 2005)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	(Brenner und Farmer, 2005)
	<i>Alcaligenes</i> sp.	+	(Knowles, 1982)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	+	(Claus und Berkeley, 1986)
Mit ANS; wässrige Phase	<i>Klebsiella</i> sp.	+	(Brenner und Farmer, 2005)
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	
Ohne ANS; Biofilm	<i>Citrobacter</i> sp.	+	(Brenner und Farmer, 2005)
	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	(Brenner und Farmer, 2005)
	<i>Bacillus</i> sp.	+	(Knowles, 1982)
Ohne ANS; wässrige Phase	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	(Brenner und Farmer, 2005)
	<i>Citrobacter youngae</i>	+	

## 5 Diskussion

### 5.1 Mikrobieller Nitratabbau unter Praxisbedingungen in unterschiedlichen Industriebetrieben

In vielen industriellen Wasserkreisläufen kommt es zu einer Anreicherung von Wasserinhaltsstoffen und chemischen Additiven. Einen solchen Anreicherungsprozess bezeichnet man im Bezug auf die anorganischen Komponenten als Aufsalzung. Besonders der Einsatz von Eisen- und Aluminiumsalzlösungen tragen hierzu bei. Die unerwünschten hohen Konzentrationen an Fremdionen im Wasserkreislauf können zu Nachteilen im Fertigungsprozess, zu Korrosion an Anlagenteilen oder zur Beeinträchtigung der Produktqualität führen (Künzel und Le, 2003; Dietz et al., 2006). Es wird daher nach Möglichkeiten gesucht, die Aufsalzung zu minimieren. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob man der Aufsalzung in Wasserkreislaufsystemen entgegenwirken kann, indem man ein Aluminiumnitrat zum Einsatz bringt, dessen Nitrationen anschließend im Wasserkreislauf durch Mikroorganismen zu gasförmigem Stickstoff abgebaut werden können.

Zu diesem Zweck wurden ursächliche Zusammenhänge zwischen der Aktivität von Mikroorganismen und dem Umsatz von Nitrat in Wasserkreisläufen von vier ausgewählten Industriebetrieben untersucht. Um die folgenden Fragen beantworten zu können, wurden zum einen unter praxisrelevanten Bedingungen und zum anderen in Laborsystemen mit Batch-Reaktoren Versuche durchgeführt:

- Findet eine Nitratreduktion durch die im Wasserkreislauf der Industriebetriebe vorhandenen Mikroorganismen statt?
- Wo findet in industriellen Wasserkreisläufen der mikrobielle Nitratabbau statt: Im Biofilm auf festen Oberflächen, in Suspension und / oder als Agglomerat in Flocken?
- Welche Gruppen von Mikroorganismen und wie viele Mikroorganismen sind an den Umsetzungen beteiligt?
- Wie beeinflussen Temperatur, Leitfähigkeit (Salzgehalt), pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Kohlenstoffquelle, Nitratmenge und Nitratquelle den mikrobiellen Nitratabbau in Wasserkreislaufsystemen?

In allen vier untersuchten Industriebetrieben lagen Wassersysteme vor, die aufgrund der mehrmaligen Verwendung des Wassers im jeweiligen Kreislauf und der Zudosierung von chemischen Additiven relativ hohe Salzkonzentrationen im Vergleich zum eingesetzten Frischwasser aufwiesen. Besonders auffällig war dies im Fall der Papierfabrik 1 mit einem komplett geschlossenen Wasserkreislauf, in dem kein Abwasser anfiel. Hier betrug die Leitfähigkeit vor dem Betriebsversuch mit ANS durchschnittlich ca. 16 – 20 mS/cm und der Chloridgehalt lag bei durchschnittlich ca. 1.500 mg/L Chlorid. Im Gegensatz zur Papierfabrik 1 waren die anderen drei Industriebetriebe keine komplett geschlossenen, sondern nur weitgehend geschlossene Wasserkreisläufe, in denen geringe Mengen Abwasser anfielen. Deshalb war die Aufsalzung in diesen drei Betrieben weniger ausgeprägt.

Die Ergebnisse der zehnwöchigen Analysen in der Papierfabrik 1 zeigten im Zeitraum der Umstellung von PACS auf ANS (beide Zudosierungen mit 15 kg/h Produkt), dass sich der Chloridgehalt im Wasserkreislauf erwartungsgemäß von ca. 1.500 mg/L auf ca. 400 mg/L Chlorid verringerte. Parallel sank auch die Leitfähigkeit um mehr als 5 mS/cm auf ca. 10 – 12 mS/cm ab. Die im Rahmen der Messungen aufgetretenen Schwankungen der Analysenwerten dürften zum einen auf das relativ kleine Wasserkreislaufvolumen von 450 m<sup>3</sup> Wasser und zum anderen auf die überwiegende Produktion an Werktagen mit Stillständen am Wochenende zurückzuführen sein. Da durch den komplett geschlossenen Wasserkreislauf kein Abwasser die Papierfabrik verlässt, war nur durch die Produktion von Papier und der im Papier enthaltenen Restfeuchte von ca. 5 % (w/w) eine Ausschleusung von Wasser bzw. den darin enthaltenen Wasserinhaltsstoffen aus dem Kreislaufsystem möglich. Deshalb bewirkte die kontinuierliche Zugabe von chemischen Additiven und den im Rohstoff Altpapier enthaltenen Salzen eine Erhöhung der Leitfähigkeit und des Chloridgehaltes innerhalb der Wochentage von Montag bis Freitag. Weitere Einflüsse, die zu Schwankungen der Analysenwerte beitrugen, waren kurze Produktionsstillstände durch technische Probleme oder Abrisse der Papierbahn, während dessen die chemischen Additive weiter dem Wasserkreislauf zudosiert wurden, aber die Papiermaschine kein Papier produzierte und somit keine Stoffe aus dem Kreislauf ausgeschleust wurden.

Ähnliche Schwankungen wie beim Chloridgehalt oder der Leitfähigkeit wurden auch beim Nitrat-, Nitrit- und Ammoniumgehalt zu Beginn der Betriebsuntersuchung in der Papierfabrik 1 festgestellt. Mit zunehmender Versuchsdauer verringerten sich diese Schwankungen der Nitrit- und Ammoniumgehalte deutlich, so dass konstante Werte < 5 mg/L ab dem 21. Versuchstag nachgewiesen wurden. Im Hinblick auf die Nitratkonzentration wurden zu Beginn der Betriebsuntersuchung Werte bis maximal

150 mg/L Nitrat ermittelt, die auf eine Anreicherung der Nitrat-Anionen im Wasserkreislauf der Papierfabrik 1 hinweisen. Theoretisch hätte jedoch ein zehnmal höherer Gehalt an Nitrat-Ionen im Wasserkreislauf nachweisbar sein sollen. Denn unter der Annahme, dass es keine anderen Eintragsquellen für Chlorid bzw. Nitrat gibt als die beiden Aluminiumsalzlösungen, sollte im Wasserkreislauf der Papierfabrik 1 eine Abnahme um ca. 1.000 mg/L Chlorid mit einer theoretischen Zunahme von ca. 1.600 mg/L Nitrat einhergehen. Entgegen dieser Erwartung konnten jedoch während der gesamten Betriebsuntersuchung keine Nitratkonzentrationen in dieser Größenordnung beobachtet werden. Stattdessen nahmen die Spitzenwerte der Nitratkonzentration mit zunehmender Versuchsdauer ab und nach ca. 30 Tagen Versuchsdauer wurden relativ konstante Werte um 50 mg/L Nitrat nachgewiesen.

In der Papierfabrik 2 sank nach der Umstellung von PACS auf ANS der Chloridgehalt im Wasserkreislauf um ca. 75 mg/L auf 175 mg/L. Vernachlässigt man auch hier andere Eintragsquellen für Chlorid bzw. Nitrat, so kann man anhand der Abnahme von ca. 75 mg/L Chlorid abschätzen, dass die Nitratkonzentration theoretisch um ca. 100 mg/L hätte zunehmen sollen. Entgegen dieser Erwartung wurde jedoch keine Veränderung beim Nitratgehalt festgestellt. Die Nitratkonzentration blieb konstant bei ca. 20 mg/L.

Der Recyclingbetrieb zur Wiederverwertung von Reststoffen aus Privathaushalten („gelbe Säcke“), wies vor der Umstellung auf ANS hohe Chloridgehalte von bis zu 1200 mg/L Chlorid auf, im Mittel betrug die Chloridkonzentration ca. 800 mg/L. Nach der Umstellung auf ANS sank der Chloridgehalt innerhalb von 15 Tagen Versuchsdauer auf ca. 300 mg/L ab. Anhand der Messwerte für die Leitfähigkeit bestätigte sich die Annahme, dass es zu einer Verringerung des Salzgehaltes im Wasserkreislauf des Recyclingbetriebes gekommen war, denn die Leitfähigkeit nahm im Rahmen der Betriebsuntersuchung nach der Umstellung von PACS auf ANS von ca. 3,5 – 4,0 mS/cm auf ca. 2,5 mS/cm ab. Nach Beendigung des Versuches mit ANS stieg die Leitfähigkeit bei Dosierung von PACS erwartungsgemäß wieder auf Werte > 3,0 mS/cm an. Da beide Aluminiumsalzlösungen mit gleicher Dosiermenge (ca. 17 kg/h Produkt) eingesetzt wurden, hätte unter der Annahme, dass es im Recyclingbetrieb keine weiteren Eintragsquellen für Chlorid oder Nitrat gibt, abgeschätzt werden können, dass eine Abnahme von ca. 500 mg/L Chlorid im Wasserkreislauf theoretisch einer Zunahme von ca. 800 mg/L Nitrat entsprechen hätte. Tatsächlich wurden aber überwiegend Nitratkonzentrationen < 30 mg/L Nitrat bestimmt und nur in wenigen Ausnahmefällen gab es Einzelmessungen mit Werten > 30 mg/L Nitrat.

Eine nahe liegende Erklärung für diese niedrigen Nitrat-Gehalte in den Wasserkreisläufen der drei Industriebetriebe wäre, dass ein mikrobieller Nitratabbau stattgefunden hat. Capdepon et al. (2002) dokumentierten bei Untersuchungen in zwei verschiedenen Papierfabriken nach Dosierung von Aluminiumnitrat eine Abnahme des Nitratgehaltes. Ebenso wie bei den in dieser Arbeit untersuchten beiden Papierfabriken stieg zu Beginn der Versuche die Nitratkonzentration an und nahm anschließend auf einen relativ konstanten, niedrigen Nitratgehalt ab. Capdepon et al. (2002) vermuteten einen mikrobiellen Nitratabbau, untersuchten die Ursache für den niedrigen Nitratgehalt jedoch nicht. Künzel und Le (2003) gingen beim Einsatz von Aluminiumverbindungen in der Papierfabrikation prinzipiell davon aus, dass nach Anwendung von Aluminiumnitrat ein mikrobieller Nitratabbau im Wasserkreislauf von Papierfabriken stattfindet. Anhand ihrer theoretischen Überlegung fände ein Austrag des Nitrates als Stickstoff über die Abluft statt. Sie verwiesen in diesem Zusammenhang auf die Untersuchung von Capdepon et al. (2002).

Nach der Umstellung auf ANS wurde in den Wasserkreisläufen der beiden Papierfabriken und des Recyclingbetriebes mehrmals zeitlich begrenzt Nitrit nachgewiesen. Da Nitrit ein Zwischenprodukt des mikrobiellen Nitratabbaus ist, deutet diese Beobachtung ebenfalls auf einen mikrobiellen Nitratabbau hin. Da nicht alle Mikroorganismen in der Lage sind, Nitrat zu Stickstoff umzusetzen, wäre es denkbar, dass Mikroorganismen vorliegen, die Nitrat nur bis zur Zwischenstufe Nitrit reduzieren können, wie dies z. B. bei *Escherichia coli* der Fall ist (Madigan und Martinko, 2006). Eine Nitrit-Akkumulation kann auch durch den Einsatz unterschiedlicher Kohlenstoffquellen (Glukose und Acetat) verursacht werden, wie Wilderer et al. (1987) durch ihre Laboruntersuchungen mit synthetischem Abwasser zeigten. Beeinflusst durch fermentative Bedingungen, vermuteten Wilderer et al. (1987), dass es zu einer stärker positiven Beeinflussung der fakultativ anaeroben Spezies kommt, die ausschließlich Nitrat reduzieren können. Echte Denitrifikanten, die auch Nitrit reduzieren können, werden dagegen benachteiligt und auf diese Weise kommt es zu einer Anreicherung von Nitrit. Betlach und Tiedje (1981) veröffentlichten Laboruntersuchungen mit drei verschiedenen denitrifizierenden Reinkulturen und einem synthetischen Nitrat-Medium, bei denen eine *Alcaligenes*-Spezies und ein *Pseudomonas fluorescens*-Isolat Nitrit akkumulierten, während dies bei einem *Flavobacterium*-Isolat nicht nachgewiesen werden konnte. Die Autoren vermuteten, dass die Anreicherung von Nitrit auf eine schnellere Nitratreduktion zu Nitrit im Vergleich zur anschließenden Nitritreduktion zurückgeführt werden konnte. McCarthy et al. (1969) und van Rijn et al. (1996) machten den Einfluss der Kohlenstoffquelle für die Nitrit-Akkumulation verantwortlich, wobei van Rijn et al. (1996) Laboruntersuchungen mit Reinkulturen von *Pseudomonas stutzeri*

durchführten und verschiedenen flüchtige Fettsäuren als C-Quelle und Elektronendonator verwendeten. McCarthy et al. (1969) dagegen untersuchten die Denitrifikation im Abwasser unter Praxisbedingungen nach Zugabe von verschiedenen Kohlenstoffquellen. Auch pH-Wert-Veränderungen wurde als Ursache für eine Anreicherung von Nitrit nachgewiesen. Beccari et al. (1983) zeigten dies durch Abwasseruntersuchungen im Labor mit Mischkulturen in Batch-Reaktoren unter kontrollierten Bedingungen. Thomsen et al. (1994) verwendeten für ihre Laboruntersuchungen Reinkulturen von *Paracoccus denitrificans* und ein synthetisches Nitrat-Medium. Sie beobachteten bei einem pH-Wert von pH 5,5 das sequentielle Auftreten der einzelnen Zwischenprodukte der Denitrifikation mit hohen Konzentrationen für Nitrit,  $N_2O$  und  $N_2$ , während bei höheren pH-Werten ab pH 6,5 nur geringe Konzentrationen für Nitrit bestimmt wurden. Glass und Silverstein (1998) zeigten durch ihre Batch-Reaktor-Untersuchungen mit Belebtschlamm und synthetischem Abwasser mit hohen Nitratgehalten von 1350 – 2700 mg/L  $NO_3-N$ , dass Veränderungen des pH-Wertes ursächlich für die Nitritakkumulation verantwortlich sind. In ihren Untersuchungen konnte mit zunehmendem pH-Wert von pH 6,5 – pH 9,0 eine zunehmende maximale Nitrit-Akkumulation bis auf ca. 1000 mg/L  $NO_2-N$  nachgewiesen werden.

Aufgrund der im Wasserkreislauf der Industriebetriebe gefundenen niedrigen Konzentrationen an Nitrat-Ionen und dem parallelen Auftreten von Nitrit liegt die Vermutung nahe, dass in den Wasserkreislaufsystemen der beiden Papierfabriken und des Recyclingbetriebes ein mikrobieller Nitratabbau stattgefunden hat. Die Phase nach der Umstellung der Dosierung von PACS auf ANS diene vermutlich zur Adaptation der im Wasserkreislauf enthaltenen Mikroorganismen an die neuen Nährstoffbedingungen, was das gelegentliche Auftreten von erhöhten Nitratkonzentration erklären könnte. Möglicherweise waren die nitratreduzierenden Bakterien nach dieser Adaptationsphase schneller in der Lage, das zudosierte Nitrat zu verwerten und deshalb wurden abnehmende Spitzenwerte für die Nitratkonzentration im weiteren Versuchsverlauf beobachtet.

In der Papierfabrik 1 wurden weitere Untersuchungen hinsichtlich des Sauerstoffgehaltes und des CSB-Wertes durchgeführt. Der mit 0,5 mg/L  $O_2$  gemessene niedrige Sauerstoffgehalt weist auf Bedingungen im Wasserkreislauf der Papierfabrik 1 hin, die durch einen Sauerstoffmangel gekennzeichnet sind. Dieser Sauerstoffmangel in der Wasserphase lässt anoxische Verhältnisse in Biofilmen und Flocken vermuten. Anhand von Untersuchungen an Belebtschlammflocken aus zwei unterschiedlichen Kläranlagen mit Hilfe von Mikrosensoren auf verschiedenen Gase und Anionen zeigten Santegoeds et al. (1998), dass im Oberflächenbereich von Flocken oder Biofilmen der vorhandene Sauerstoff schnell aufgezehrt wird und der

mikrobielle Nitratabbau auf diese Weise gefördert wird. Die meisten denitrifizierenden Mikroorganismen sind in der Lage sowohl aerob als auch anaerob zu atmen. Falls genügend Sauerstoff vorhanden ist, wird der aeroben Atmung der Vorzug gegeben und falls der Sauerstoffgehalt unzureichend ist, kann Nitrat als alternativer Elektronenakzeptor für die fakultativ anaeroben Mikroorganismen fungieren (Madigan und Martinko, 2006). Hagedorn-Olsen et al. (1994) zeigten anhand von Labor- und Betriebsuntersuchungen mit denitrifizierenden Mikroorganismen in Biofiltern, dass mit zunehmendem Sauerstoffgehalt im Wasser der mikrobielle Nitratabbau abnimmt und ab 6 mg/L O<sub>2</sub> kein mikrobieller Nitratabbau mehr stattfand. Dies bestätigten Körner und Zumft (1989) mit ihren Laboruntersuchungen an *Pseudomonas stutzeri*-Isolaten zur Expression von Enzymen, die an der Denitrifikation beteiligt sind. Sie wiesen in Anwesenheit von Nitrat einen Schwellenwert von ca. 5 mg/L O<sub>2</sub> für die Bildung von Nitratreduktase und ca. 2,5 mg/L O<sub>2</sub> für die Bildung von Nitritreduktase nach.

Die Ergebnisse der CSB-Analysen in der Papierfabrik 1 und auch für die Papierfabrik 2 zeigten, dass es mit der Dosierung von ANS zu einer deutlichen Abnahme der organischen Verbindungen im Wasserkreislauf der beiden Papierfabriken gekommen ist. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre z. B. eine verbesserte Koagulation des ANS im Vergleich zum PACS, so dass mehr organische Kolloide bzw. Feinstoffe durch die Flotation abgetrennt wurden. Eine zweite Möglichkeit wäre, die Abnahme des CSB durch den mikrobiellen Nitratabbau zu erklären. Durch den heterotrophen Stoffwechsel von nitratreduzierenden Bakterien könnten gemäß Gleichung (15) in Kapitel 1.8 organische Kohlenstoffverbindungen aus dem Wasserkreislauf oxidiert werden und in Folge dessen würde der CSB-Gehalt abnehmen. Im Hinblick auf den CSB-Gehalt im Wasserkreislauf des Recyclingbetriebs konnten keine Aussagen zu Tendenzen gemacht werden, da die Messwerte stark streuten. Verursacht wurde dies vermutlich durch das kleine Kreislaufvolumen von 100 m<sup>3</sup> Inhalt und den produktionsbedingt stark schwankenden Eintrag von organischen Stoffen in das Wasserkreislaufsystem. Eine weitere Erklärung für den Rückgang des CSB-Wertes nach Dosierung von ANS wäre im veränderten C:N-Verhältnis zu suchen. Bei einem ungünstigen C:N – Verhältnis (C:N > 10:1) und wenig Sauerstoff sollte nur ein begrenzter aerober Abbau möglich sein. Aufgrund der Dosierung von ANS könnte das C:N-Verhältnis verbessert werden und auf diese Weise ein weiterer Abbau von Kohlenstoffverbindungen möglich sein.

Im Falle des metallverarbeitenden Betriebes wurden während der Dosierung von PACS Chloridkonzentrationen im Wasserkreislauf von ca. 500 mg/L nachgewiesen. Nach der Umstellung von PACS auf ANS sank die Chloridkonzentration innerhalb von 100 Tagen auf Werte von ca. 150 mg/L Chlorid ab. Unter der Annahme, dass die

beiden Aluminiumsalzlösungen mengengleich dosiert wurden und andere Eintragsquellen für Chlorid und Nitrat ausgeschlossen sind, hätte ausgehend von einer gemessenen Abnahme um ca. 350 mg/L Chlorid theoretisch eine Zunahme um ca. 560 mg/L Nitrat abgeschätzt werden können. Bei den Analysen des Kreislaufwassers wurde tatsächlich eine Zunahme der Nitratkonzentration bis auf 500 – 600 mg/L Nitrat nachgewiesen. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass es im Wasserkreislauf des metallverarbeitenden Betriebes zu keinem nachweisbaren mikrobiellen Nitratabbau gekommen ist.

Zusammenfassend lässt sich für die vier Betriebsuntersuchungen an dieser Stelle festhalten, dass in den beiden Papierfabriken und dem Recyclingbetrieb im Verlauf des Einsatzes von ANS eine Nitratabnahme nachgewiesen wurde und ein mikrobieller Nitratabbau als Ursache für die Nitratabnahme angenommen werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte im Falle des metallverarbeitenden Betriebes kein Nitratabbau festgestellt werden. Um Mikroorganismen mit der Abnahme von Nitrat in Zusammenhang bringen zu können, waren mikrobiologische Untersuchungen erforderlich. Die mikrobiologischen Analysen wurden zum einen im Rahmen der Betriebsuntersuchungen an Biofilm- bzw. Wasserproben und zum anderen mit Hilfe von Batch-Reaktoren im Labor durchgeführt.

## **5.2 Mikrobiologische Analysen aus den Betriebsuntersuchungen**

In den beiden Papierfabriken und dem Recyclingbetrieb wurden im Rahmen der visuellen und lichtmikroskopischen Untersuchung dicke, graue Biofilme mit einem Faseranteil beobachtet. Der Biofilm aus dem metallverarbeitenden Betrieb war ebenfalls dick, wies aber keinen Faseranteil auf und hatte eine schwarze Farbe. Diese beiden unterschiedlichen Beobachtungen lassen sich vermutlich durch die unterschiedlichen Charakteristika der Wasserkreisläufe in den vier Industriebetrieben erklären. Im Fall der ersten drei Betriebe handelte es sich um Wasserkreisläufe, die einen hohen Anteil an Cellulosefasern in der wässrigen Phase von ca. 0,5 % – 4,0 % (w/w) aufwiesen. Bei der Bildung der Biofilme in solchen Systemen werden vermutlich Fasern oder Faserbruchstücke an der Oberfläche des Biofilms adsorbiert, wie Pauly und Dietz (2006) in Biofilmproben aus drei verschiedenen Papierfabriken nachwiesen.

Im Wasserkreislauf des metallverarbeitenden Betriebs, der das Wasser hauptsächlich zur Kühlung von mit flüssigem Metall befüllten Kokillen nutzt, konnten keine Fasern in den Biofilmproben nachgewiesen werden. Im Produktionsprozess bilden sich aufgrund der hohen Temperaturen feine Rußpartikel, die sich von den



Kokillen ablösen und in den Wasserkreislauf gelangen. In der Wasseraufbereitung konnten die Rußpartikel dann durch das Aluminiumsalz koaguliert werden und es bildeten sich schwarze Flocken. Da die schwarzen Rußpartikel oder Flocken am Biofilm adsorbierten, konnten sie sich dort einlagern und eine schwarze Färbung des Biofilms hervorrufen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Biofilme aus den vier verschiedenen Industriebetrieben wiesen einen Trockenrückstand von 4 – 12 % auf und hatten dem entsprechend einen Wassergehalt von 88 – 96 %. Im Fall von Biofilm-Untersuchungen in Industriebetrieben und im Besonderen für Papierfabriken fanden Claus und Müller (1996) ca. 10 % Trockenrückstand bei Biofilm-Untersuchungen in einer Papierfabrik für Lebensmittelpapiere, und Babenko (2006) wies 5 – 7 % Trockenrückstand bei Untersuchungen von Biofilmen aus einer Zeitungsdruck-Papierfabrik nach. Klahre et al. (1997) veröffentlichten in einer Arbeit zu mikrobiellen Problemen in der Papierfabrikation Orientierungswerte für den Wassergehalt von Biofilmen mit 80 – 98 %.

Der Glühverlust der Biofilmproben betrug bei den durchgeführten Analysen 2 – 7 % vom Feuchtgewicht der Biofilmproben und lag im Mittel bei ca. 4 %. Auch diese Ergebnisse waren mit den von Babenko (2006) ermittelten Werten von 3 – 4 % Glühverlust in Biofilmen aus einer Zeitungsdruck-Papierfabrik vergleichbar. Claus und Müller (1996) dagegen fanden mit 6 – 8 % Glühverlust vom Feuchtgewicht etwas höhere Werte bei ihren Untersuchungen an Biofilmen in einer Papierfabrik für Lebensmittelpapiere.

Die Ergebnisse der durchgeführten Analysen lassen für die jeweiligen Biofilmproben aus den Industriebetrieben nach der Dosierung von ANS eine tendenzielle Zunahme des Trockenrückstandes und des Glühverlustes mit der Zeit erkennen. Die tendenzielle Zunahme des Trockenrückstandes scheint durch die Zunahme des Glühverlustes verursacht zu sein. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre eine „Alterung“ des Biofilms, die gleichbedeutend ist mit einer Erhöhung des organischen Materials im Biofilm durch Wachstum der Zellen und Bildung von EPS, wie es von Marty et al. (1992) und Rode (2004) bereits beschrieben worden ist.

Bei der weiteren Analyse des Trockenrückstandes der Biofilmproben erhält man durch Glühen die Anteile von Glühverlust und Glührückstand. Der Glührückstand der Biofilmprobe umfasst zumeist anorganisches Material, wie z. B. Füllstoffteilchen ( $\text{CaCO}_3$ ) und Korrosionsprodukte ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). Es kann im Glührückstand jedoch auch Ruß, wie im Fall des metallverarbeitenden Betriebes enthalten sein. Der Glühverlust dagegen umfasst den organischen Anteil der Biofilmproben mit Mikroorganismen und

extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), sowie Cellulosefasern im Falle der Wasserkreisläufe von Papierfabriken. Die Anteile von Glühverlust und Glührückstand des Trockenrückstandes betrugen für alle untersuchten Proben 50 – 80 % Glühverlust und 20 – 50 % Glührückstand. Dabei wiesen die Papierfabrik 1 und der Recyclingbetrieb ein ähnliches Verhältnis von ca. 70 % Glühverlust zu 30 % Glührückstand auf. Diese Ergebnisse weisen auf einen hohen Anteil an organischen Bestandteilen in den Biofilmen aus diesen beiden Betrieben hin und bestätigen die von Claus und Müller (1996), sowie Babenko (2006) gefundenen Verhältnisse von 50 – 75 % Glühverlust in Biofilmprouben aus zwei verschiedenen Papierfabriken.

Im Fall des metallverarbeitenden Betriebes verschob sich das Verhältnis von Glühverlust zu Glührückstand mit 60 % Glühverlust zu 40 % Glührückstand in Richtung eines höheren Glührückstandes und bedeutete damit mehr anorganisches Material in den Biofilmprouben. Für die Papierfabrik 2 wurde ein Verhältnis von 50 % zu 50 % für das Verhältnis von Glühverlust zu Glührückstand bestimmt. Damit wies die Papierfabrik 2 den höchsten Glührückstand in allen untersuchten Proben auf und zeigte ein deutlich anderes Ergebnis, als die vom Industrietyp vergleichbare Papierfabrik 1.

Um Mikroorganismen in den Biofilmprouben aus den Industriebetrieben quantifizieren zu können, mussten die Biofilme zuerst dispergiert werden, um die Zellen zu vereinzeln. Drei verschiedene mechanische Dispergiermethoden wurden in dieser Arbeit auf ihre Eignung überprüft. Für die Untersuchungen wurden Biofilme aus der Papierfabrik 1 und dem Recyclingbetrieb verwendet. Die Eignung der Dispergiermethoden wurde anhand der Gesamtzellzahl- und der Koloniezahl-Bestimmung bewertet.

Die Dispergierung mit einem Reagenzglasschüttler zeigte die schlechtesten Ergebnisse, da größere Agglomerate des Biofilms erhalten blieben und nicht dispergiert werden konnten. Aufgrund dessen wurde die Dispergierung von Biofilmprouben aus Industriebetrieben mit einem Reagenzglasschüttler als nicht geeignet bewertet. Die Zelldispergierung mit einem „Stomacher“ (Walkgerät) und mit einem Hochgeschwindigkeitsrührer des Typs Ultra-Turrax ergaben annähernd gleiche Zellausbeuten, wobei der Ultra-Turrax tendenziell eine etwas höhere Zellausbeute sowohl bei der Gesamtzellzahlbestimmung als auch bei der Koloniezahl-Bestimmung aufwies. Die höchsten Zellausbeuten im Hinblick auf Gesamtzellzahl und Koloniezahl wurden mit einem Ultra-Turrax bei einer Drehzahl von 22.000 U/min und einer Dispergierdauer von 30 s erhalten. Deshalb wurde diese Variante als Standardmethode für die Dispergierung von Biofilmen ausgewählt. Buesing und Gessner (2002) fanden bei ihren Untersuchungen zur Zelldispergierung

von Sedimenten, Laubabfall und epiphytischen Biofilmen, dass die Probenmatrix einen erheblichen Einfluss auf die Zellausbeute bei fünf unterschiedlichen Dispergiermethoden (Ultraschallbad, Ultraschallsonde, Stomacher, Ultra-Turrax, Reagenzglasschüttler) hatte und die Verwendung eines Reagenzglasschüttlers die Methode mit den niedrigsten Zellausbeuten war. Eine einminütige Behandlung bei 22.000 U/min mit einem Ultra-Turrax ergab für die drei oben genannten Probenmatrices Zellausbeuten in der gleichen Größenordnung wie die Behandlung mit Ultraschall. Bei der Dispergierung von Laubabfall erhielten Buesing und Gessner (2002) mit einem Ultra-Turrax im Vergleich zum Stomacher höhere Zellausbeuten, während bei der Dispergierung von epiphytischen Biofilmen und Sedimenten ähnliche Zellausbeuten ermittelt wurden. Scheen (2003) zeigte, dass die Verwendung eines Ultra-Turrax eine geeignete Dispergiermethode für Biofilmproben ist und deutlich höhere Zellausbeuten als die Verwendung eines Handhomogenisators liefert. In seinen Untersuchungen wurden Biofilme verwendet, die in Laborreaktoren mit einem synthetischen Medium angezüchtet worden waren. Als Inokulum war Belebtschlamm aus einer kommunalen Kläranlage verwendet worden. Scheen (2003) konnte zeigen, dass durch die hohen Drehzahlen des Ultra-Turrax (20.000 U/min) keine Abnahme der Anzahl an kultivierbaren Bakterien resultierte.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Anwesenheit von Mikroorganismen und einem durch sie verursachten mikrobiellen Nitratabbau. Nachdem für drei der vier Industriebetriebe nach Anwendung von ANS der Nitratgehalt im Wasserkreislauf deutlich niedriger als erwartet ausgefallen war und dies auf einen möglichen mikrobiellen Nitratabbau hindeutete, sollte die Anwesenheit von nitratreduzierenden Mikroorganismen in den Betrieben nachgewiesen werden und in Bezug zur Gesamtzellzahl und Koloniezahl gesetzt werden. Deshalb wurden in allen Betriebsuntersuchungen Biofilm- und Wasserproben entnommen und auf die Gesamtzellzahl, Koloniezahl sowie Anzahl der nitratreduzierenden Bakterien untersucht. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfasste als mikroskopische Untersuchung die gesamte Anzahl an vorhandenen Mikroorganismen, nach Anfärbung mit einem DNA-spezifischen Farbstoff (DAPI) und anschließendem Auszählen der Zellen unter dem Epifluoreszenzmikroskop. Bei dieser Methode wird allerdings nicht berücksichtigt, ob die Mikroorganismen noch stoffwechselaktiv sind oder nicht. Die Bestimmung der Koloniezahl wurde als zusätzliche kulturelle Methode zur Quantifizierung eingesetzt, um Aussagen über die Zahl der vermehrungsfähigen Mikroorganismen und den Zustand der Population machen zu können. Die Anzucht der Bakterien erfolgte mit R2A-Agar für 7 Tage bei 40 °C. Um gezielt die nitratreduzierenden Bakterien (NRB) nachzuweisen, wurde ein MPN-Verfahren mit einem Dreifach-Ansatz als Flüssigkeitsanreicherung in

Nitratbouillon durchgeführt, um NRB in Biofilm- und Wasserproben aus den untersuchten Betrieben selektiv zu vermehren und quantifizieren zu können.

In den Biofilmpuben aus den beiden Papierfabriken und dem Recyclingbetrieb konnten für die Gesamtzellzahl insgesamt hohe Werte von  $10^{10}$  bis maximal  $5 \times 10^{12}$  Zellen/g Feuchtgewicht (FG) und für die Koloniezahl  $10^9$  bis maximal  $10^{10}$  KBE/g FG bestimmt werden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit Angaben aus der Literatur, so zeigt sich, dass Werte in ähnlicher Größenordnung für die Gesamtzellzahl und Koloniezahl von Biofilmpuben aus Papierfabriken bereits an anderer Stelle berichtet wurden. Claus und Müller (1996), sowie Babenko (2006) wiesen in Biofilmpuben aus Papierfabriken um eine Zehnerpotenz niedrigere Gesamtzellzahlen von  $10^9 - 10^{10}$  Zellen/g FG nach. Die ermittelten Koloniezahlen für die Biofilmpuben lagen bei den Untersuchungen von Claus und Müller (1996) in gleicher Größenordnung von  $10^9 - 10^{10}$  KBE/g FG und bei den Analysen von Babenko (2006) wurden zwischen  $10^8 - 10^9$  KBE/g FG nachgewiesen.

Im Fall der Biofilme aus den beiden Papierfabriken wurden relativ hohe Anteile der Koloniezahl an der GZZ nachgewiesen und im Fall des Recyclingbetriebes waren die Ergebnisse der Gesamtzellzahl- und der Koloniezahlbestimmung sogar annähernd gleich groß, was darauf hinweist, dass die Nährstoffsituation für Mikroorganismen in den Wasserkreisläufen dieser drei Industriebetriebe gut sein dürfte. Untersuchungen in Pflanzenkläranlagen von Fernandes (2006) ergaben unter guten Nährstoffbedingungen maximale Anteile für kultivierbare Mikroorganismen an der Gesamtzellzahl im niedrigen einstelligen Prozent-Bereich. Wingender und Flemming (2004) untersuchten 18 verschiedene Biofilme aus dem Trinkwasserverteilungsnetz in Deutschland, wo für Bakterien Nährstoffmangelbedingungen vorliegen und ermittelten einen Anteil von 0,0004 % – 3,5 % der kultivierbaren Zellen an der Gesamtzellzahl. Siebel et al. (2008) veröffentlichten Ergebnisse aus Trinkwasseruntersuchungen, bei denen durchschnittlich 2 % der bestimmten Gesamtzellzahl als koloniebildende Einheiten wieder gefunden werden konnten. Van der Kooij (2003) fand bei Analysen von Trinkwasser-Biofilmen einen Anteil der Koloniezahl an der Gesamtzellzahl von nur < 1%. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den vorgenannten Untersuchungen fanden Kilb et al. (2003) im Trinkwasserverteilungsnetz unter ähnlichen Bedingungen auf Ventilen, die mit Gummi beschichtet waren, ganz andere Verhältnisse vor. Dort konnte ein deutlich höherer Anteil von 2 % – 73 % der kultivierbaren Zellen an der Gesamtzellzahl ermittelt werden. Dieses Ergebnis weist auf eine deutlich günstigere Nährstoffsituation im Biofilm auf den gummibeschichteten Ventilen gegenüber der Situation für die Mikroorganismen im Biofilm auf den Rohrleitungen hin. Verantwortlich für diesen Befund waren die als „Weichmacher“ bezeichneten Additive in der Gummi-

Beschichtung. Sie konnten von den Mikroorganismen im Biofilm als Nährstoffe verwertet werden.

In Biofilmproben aus den beiden Papierfabriken wurden NRB in einer Konzentration zwischen  $10^7$  und  $10^9$  MPN/g Glühverlust nachgewiesen und die höchsten Werte für Nitratreduzierer wurden im Fall des Recyclingbetriebes mit bis zu  $10^{11}$  MPN/g Glühverlust erhalten, was einem Anteil von ca. 55 % NRB an der GZZ entsprach. Angaben für NRB in Biofilm- oder Wasserproben aus industriellen Wasserkreisläufen wurden bislang noch nicht veröffentlicht. Ein Vergleich ist jedoch mit Ergebnissen für Biofilm- und Wasserproben aus dem öffentlichen Kanalnetz oder mit Belebtschlämmen möglich. Lemmer et al. (1993) untersuchten Biofilme von Kanalwänden, die zum einen häusliches Abwasser und zum anderen gewerbliches Abwasser transportierten und zwei Belebtschlämme aus einer hoch und einer niedrig belasteten Stufe einer kommunalen Kläranlage. Sie wiesen ähnlich hohe NRB-Konzentrationen in Höhe von  $4 \times 10^{11}$  MPN/g Glühverlust in Biofilmen aus häuslichen Abwasserkanälen nach, während in Biofilmen aus gewerblichen Abwasserkanälen sogar  $1 \times 10^{12}$  MPN/g Glühverlust nachgewiesen wurden. Im Vergleich dazu wurden im Belebtschlamm aus der Hochlaststufe ca.  $4 \times 10^{10}$  MPN/g Glühverlust und im Belebtschlamm der Niedriglaststufe eine Logstufe weniger NRB mit ca.  $5 \times 10^9$  MPN/g Glühverlust gefunden. Eine Korrelation der ermittelten Zellzahlen mit einem durch die Mikroorganismen verursachten Nitratabbau wurde von Lemmer et al. (1993) nicht untersucht. Die Koloniezahl lag bei den untersuchten Biofilmproben aus beiden Kanälen und dem Belebtschlamm aus der Hochlaststufe ebenfalls im Bereich von  $10^{10}$  KBE/g Glühverlust, wie bei den Biofilmproben aus den Industriebetrieben, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Der Belebtschlamm der Niedriglaststufe wies eine Koloniezahl auf, die um eine Logstufe niedriger war.

Bei den Analysen der Wasserproben wurden im Kreislaufwasser der beiden Papierfabriken Gesamtzellzahlen zwischen  $10^9$  und  $10^{10}$  Zellen/mL nachgewiesen und im Recyclingbetrieb ein maximaler Wert von  $3 \times 10^{11}$  Zellen/mL beobachtet. Wie bei den Analysen der Biofilmproben ergab auch die Analyse der Wasserprobe aus dem metallverarbeitenden Betrieb im Vergleich zu den übrigen drei Betrieben, bei der Gesamtzellzahl eine um mehr als drei Logstufen niedrigere Zellzahl.

Bei der Koloniezahl-Bestimmung der Wasserproben aus der Papierfabrik 2 wurde bei allen drei Analysen, vor und nach der Umstellung auf ANS, eine unveränderte Anzahl koloniebildender Einheiten in der Größenordnung von  $10^8$  KBE/mL nachgewiesen, was darauf hinweist, dass die Umstellung des Koagulanten von PACS auf ANS im Hinblick auf die Anzahl der kultivierbaren Mikroorganismen im Wasserkreislauf der

Papierfabrik keinen Einfluss zu haben schien. Babenko (2006) veröffentlichte ebenfalls Ergebnisse für die Koloniezahl von Proben aus dem Wasserkreislauf einer Papierfabrik in Höhe von  $10^8$  KBE/mL.

Der Anteil der Koloniezahl an der Gesamtzellzahl war in allen drei untersuchten Wasserproben aus der Papierfabrik 2 relativ hoch und betrug zwischen 10 % und 45 %, was auf eine relativ gute Nährstoffsituation für die Mikroorganismen in der Wasserphase hinweist. Analoge Untersuchungsergebnisse mit einem hohen Anteil der Koloniezahl von 30 – 65 % an der Gesamtzellzahl wurden auch in der Arbeit von Babenko (2006) berichtet.

Besonders auffällig waren die hohen Konzentrationen für NRB ( $10^{10}$  MPN/mL) in Wasserproben aus dem Recyclingbetrieb. Im Vergleich zur Gesamtzellzahl von  $3 \times 10^{11}$  Zellen/mL war ein großer Anteil der in der Wasserphase suspendierten Zellen in der Lage, Nitrat zu verwerten. Ein ähnliches Ergebnis wurde für alle vier untersuchten Industriebetriebe festgestellt, denn auch hier lag der Anteil der NRB an der Gesamtzellzahl mehrfach  $> 1$  %. In den Wasserproben aus der Papierfabrik 1 wurden im Vergleich zum Recyclingbetrieb etwas niedrigere Werte für die Nitratreduzierer von  $10^8 - 10^9$  MPN/mL gefunden. In den Wasserproben aus der Papierfabrik 2 wurden dagegen um zwei Logstufen niedrigere Konzentrationen an NRB von  $10^6 - 10^7$  MPN/mL als im Vergleich zur Papierfabrik 1 bestimmt. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied zwischen beiden Papierfabriken wäre der niedrigere CSB-Wert im Wasserkreislauf der Papierfabrik 2, der eine weniger gute Nährstoffsituation für die Mikroorganismen bedeuten könnte. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Papierfabriken besteht in der Dosierung eines Mikrobiozides in der Papierfabrik 2. Hierdurch könnten Mikroorganismen abgetötet oder inaktiviert werden, so dass sie mit der MPN-Methode nicht mehr erfasst werden könnten.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den beiden Papierfabriken und dem Recyclingbetrieb wiesen die Analysenergebnisse der Biofilmproben aus dem metallverarbeitenden Betrieb um drei bis fünf Logstufen weniger koloniebildende Einheiten ( $10^7$  KBE/g Glühverlust) und auch um eine Logstufe weniger Nitratreduzierer ( $10^6$  MPN/g Glühverlust) auf. Auffällig ist an diesen Werten, dass zwar die Anzahl koloniebildender Einheiten deutlich geringer ausfiel, aber der Anteil der NRB an der Koloniezahl den übrigen drei Betrieben ähnelte.

Mikroorganismen, die in der Lage sind Nitrat als Nährstoff zu verwerten, wurden in Biofilm- und Wasserproben aus allen vier Industriebetrieben nachgewiesen. Eine kausale Verknüpfung zwischen den im Wassersystem vorhandenen Mikro-

organismen und der Abnahme der Nitratkonzentration, war durch die bisherigen Untersuchungen allerdings noch nicht möglich. Da es unter den Bedingungen, die in den Wasserkreisläufen vorlagen, keine Möglichkeit gab Nitrat auf chemische Weise zu reduzieren (Mateju et al., 1992; Daum, 2002) und Nitrit als ein Zwischenprodukt des mikrobiellen Nitratabbaus nachgewiesen wurde, liegt aber die Vermutung nahe, dass es sich bei der festgestellten Nitratabnahme um einen mikrobiellen Nitratabbau handelt.

Um einen direkten Beweis für die mikrobielle Nitratreduktion zu führen, wurde exemplarisch in der Papierfabrik 1 eine Batch-Untersuchung mit drei verschiedenen Ansätzen durchgeführt (Kapitel 4.4). Bei den beiden Ansätzen mit Kreislaufwasser aus der Papierfabrik, die konstant bei 35 °C gehalten worden waren, konnte ein deutlicher Rückgang der Nitratkonzentration innerhalb von 4 Stunden Versuchsdauer festgestellt werden. Der Ansatz, dem zusätzlich zu den im Wasser vorhandenen Mikroorganismen noch Biofilm zugefügt worden war, wies den größten Nitratabbau auf. Im Kontrollansatz, bei dem das Wasser auf Siedetemperatur erhitzt worden war, wurden die enthaltenen Mikroorganismen abgetötet und deshalb konnte keine Abnahme der Nitratkonzentration innerhalb der Versuchsdauer nachgewiesen werden. Fasst man die unterschiedlichen Ergebnisse aus den drei Batch-Ansätzen zusammen, wurde durch diesen Versuch nachgewiesen, dass es sich bei der Abnahme der Nitratkonzentration im Wasserkreislauf der Papierfabrik 1 um ein mikrobiologisches Phänomen handelt und sowohl die Mikroorganismen in der Wasserphase als auch Mikroorganismen im Biofilm einen Beitrag zum Nitratabbau leisten.

Zusätzlich zu den Biofilm- und Wasserproben aus dem Kreislauf der Industriebetriebe wurde im Fall des metallverarbeitenden Betriebes auch das Frischwasser auf die Gesamtzellzahl, Koloniezahl und NRB untersucht. Die Analyse der Frischwasserprobe aus dem metallverarbeitenden Betrieb ergab nur 80 KBE/mL, obwohl bei der Gesamtzellzahl-Bestimmung  $9 \times 10^4$  Zellen/mL gezählt wurden. Eine Gesamtzellzahl-Bestimmung der Frischwasserprobe aus dem Recyclingbetrieb ergab  $1 \times 10^5$  Zellen/mL und lag in der gleichen Größenordnung wie das Frischwasser aus dem metallverarbeitenden Betrieb. Babenko (2006) veröffentlichte für die Bestimmung der Gesamtzellzahl in Frischwasserproben aus einer Papierfabrik Ergebnisse in der gleichen Größenordnung. NRB konnten im Frischwasser des metallverarbeitenden Betriebes mit nur 23 MPN/mL nachgewiesen werden. Der Unterschied zwischen der Gesamtzellzahl und der Koloniezahl bzw. Anzahl NRB lässt sich durch die betriebsinterne Frischwasseraufbereitung mit anschließender Desinfektion erklären. Durch die Aufbereitung des Frischwassers konnten Mikroorganismen nur teilweise aus dem Wasser entfernt werden. Die Desinfektion im

Anschluss tötete jedoch vermutlich die enthaltenen Zellen ab bzw. schädigte sie derart, dass sie nicht mehr auf R2A-Agar kultivierbar waren oder mit der MPN-Methode für Nitratreduzierer erfasst werden konnten.

In der Kreislaufwasserprobe des metallverarbeitenden Betriebes wurden NRB-Konzentrationen im Zulauf zur Reinigungsstufe von  $1 \times 10^5$  MPN/mL nachgewiesen. In der gleichen Wasserprobe wurde eine Koloniezahl von  $2 \times 10^5$  KBE/mL und eine Gesamtzellzahl von  $4 \times 10^6$  Zellen/mL bestimmt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es im Wasserkreislauf des metallverarbeitenden Betriebes zu einer Vermehrung der kultivierbaren und nitratreduzierenden Mikroorganismen gekommen ist, denn die Konzentration der Nitratreduzierer und die Koloniezahl heterotropher Bakterien hatten sich gegenüber der Frischwasserprobe jeweils um den Faktor 10.000 erhöht, während die Gesamtzellzahl nur um den Faktor 100 zunahm. Da während der Betriebsuntersuchung aber keine Nitrat-Abnahme festgestellt werden konnte, besteht zum einen die Möglichkeit, dass diese Konzentration an NRB nicht hoch genug ist, um eine messbare Nitrat-Abnahme im Wasserkreislauf hervorzurufen. Zum anderen könnten die nachgewiesenen NRB zwar im Wasserkreislauf vorhanden gewesen sein, waren aber nicht in der Lage unter den dort vorliegenden Praxisbedingungen Nitrat zu verstoffwechseln (Tabelle 5.1). Als mögliche Gründe wären die kurzzeitig erhöhte Wassertemperatur ( $> 100^\circ\text{C}$ ) und / oder die ungünstigen Nährstoffverhältnisse zu nennen.



Tabelle 5.1: Übersicht der vier untersuchten Industriebetriebe im Hinblick auf die mikrobiologische Beschaffenheit der Wasserkreisläufe: Gesamtzellzahl (GZZ), Koloniezahl (KZ) und Nitratreduzierer (NRB) in Wasser- und Biofilmproben. N. a. nicht auswertbar.

Parameter	Papierfabrik 1	Papierfabrik 2	Recyclingbetrieb	Metallverarbeitender Betrieb
Mikrobieller Nitratabbau	Ja	Ja	Ja	Nein
GZZ Wasser [Zellen/mL]	$2 \times 10^9 - 4 \times 10^9$	$1 \times 10^9 - 2 \times 10^9$	$7 \times 10^9 - 4 \times 10^{10}$	$4 \times 10^6$
GZZ Biofilm [Zellen/g GV]	$9 \times 10^{11} - 2 \times 10^{12}$	$1 \times 10^{11} - 2 \times 10^{11}$	$3 \times 10^{11} - 1 \times 10^{13}$	n. a.
KZ Wasser [KBE/mL]	n. a.	$2 \times 10^8 - 5 \times 10^8$	n. a.	$2 \times 10^5$
KZ Biofilm [KBE/g GV]	$3 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{10} - 2 \times 10^{10}$	$6 \times 10^{11}$	$3 \times 10^7$
NRB Wasser [MPN/mL]	$2 \times 10^8 - 5 \times 10^9$	$2 \times 10^6 - 4 \times 10^7$	$9 \times 10^9$	$1 \times 10^5$
NRB Biofilm [MPN/g GV]	$1 \times 10^7 - 7 \times 10^8$	$2 \times 10^8 - 2 \times 10^9$	$2 \times 10^{11}$	$2 \times 10^6$

Um die erhaltenen Zahlenwerte für die Gesamtzellzahl, die Koloniezahl und die Nitratreduzierer besser interpretieren zu können, wurden die Analysenergebnisse nicht nur mit den weiter oben genannten Literaturangaben verglichen, sondern sie sollten auch im Hinblick auf ihre Plausibilität überprüft werden. Deshalb wurde versucht, die maximal mögliche Anzahl von Mikroorganismen im Biofilm abzuschätzen bzw. zu berechnen.

Unter der Annahme, dass ein Bakterium ein Feuchtgewicht von 1 pg (Pikogramm) hat, (Madigan und Martinko, 2006) und das Feuchtgewicht eines Biofilmes bei 1 g/mL liegt, ist es plausibel, wenn maximal  $10^{12}$  Zellen im Feuchtgewicht Biofilm bzw. pro mL Wasserprobe enthalten sind (Gleichung 21).

$$(10^{-12} \text{ g/Zelle}) \times (10^{12} \text{ Zellen/mL}) = 1 \text{ g/mL} \quad (21)$$

Bei einem Bezug auf den Glühverlust, also den organischen Anteil des Biofilmes erhöht sich diese Angabe noch einmal um den Faktor 10, da ungefähr 90 % des

Feuchtgewichtes eines Biofilms aus Wasser besteht. Aus diesem Grund sollten in Biofilmproben maximal ca.  $10^{13}$  Zellen/g Glühverlust enthalten sein.

Ein zweiter Weg zur Plausibilitätsprüfung der maximal möglichen Zellzahl im Biofilm bzw. in Wasserproben, ist über das Volumen möglich, das ein Bakterium einnimmt. Unter der Annahme, dass ein einzelnes Bakterium (Stäbchen)  $1\text{ }\mu\text{m}$  lang und  $0,5\text{ }\mu\text{m}$  dick ist, ergibt sich für  $1,0\text{ cm}^3$  bzw.  $1,0\text{ mL}$ :

$$(10^4) \times (2 \times 10^4) \times (2 \times 10^4) \text{ Zellen/cm}^3 = 4 \times 10^{12} \text{ Zellen/cm}^3 \quad (22)$$

Fasst man die Ergebnisse aus den beiden Methoden zur Plausibilitätsprüfung der maximal möglichen Zellzahl innerhalb eines Gramms Feuchtgewicht Biofilm zusammen, so ergeben sich  $4 \times 10^{12}$  bzw.  $1 \times 10^{12}$  Zellen.

Vergleicht man diese berechneten maximal möglichen Ergebnisse mit den tatsächlich in Biofilmen gefundenen Gesamtzellzahlen aus den Betriebsuntersuchungen, fällt auf, dass die Beläge aus dem Recyclingbetrieb bzw. der Papierfabrik 1 nur um ein bis zwei Logstufen unter der maximal mögliche Gesamtzellzahl sowohl im Biofilm, als auch in der Wasserprobe lagen.

Nachdem der mikrobielle Nitratabbau in industriellen Wasserkreisläufen unter praxisrelevanten Bedingungen nachgewiesen wurde, sollten detaillierte Laboruntersuchungen zum mikrobiellen Nitratabbau folgen.

### **5.3 Laboruntersuchungen zum mikrobiellen Nitratabbau**

Um die mikrobiellen Vorgänge in Wasserkreislaufsystemen von Papierfabriken oder anderen Industriebetrieben im Labor eingehender untersuchen zu können, sollte ein Labor-Reaktorsystem zur Simulation realer Verhältnisse in Wasserkreisläufen von Papierfabriken etabliert werden. Die Labor-Versuchsanlage sollte ein Wachstum von Mikroorganismen in der wässrigen Phase und auf Oberflächen als Biofilm gewährleisten und wurde aus diesen Gründen als Batch-Reaktor mit exponierten Stahlcoupons konzipiert.

Um gezielt die Wachstumsbedingungen und die Aktivität von NRB untersuchen zu können, musste zunächst ein geeignetes Nährmedium für den Batch-Reaktor gefunden werden:

1) Versuche mit Kreislaufwasser aus der Papierfabrik 1 als Nährmedium ohne zusätzliches Inokulum ließen bei regelmäßigem zweitägigem Wasserwechsel visuell keinen Biofilm auf den im Reaktor enthaltenen Stahlcoupons erkennen.

2) Die Zugabe einer Dickstoffprobe aus der Papierfabrik 1 brachte als Inokulum mit einer Mischpopulation von ca.  $10^{10}$  Zellen/mL und einem Anteil an NRB von  $4 \times 10^8$  MPN/mL ebenfalls keine Verbesserung im Hinblick auf die Biofilmbildung im Batch-Reaktor mit entionisiertem Wasser.

3) Im Batch-Reaktor mit 500 mg/L Nitrat (Kaliumnitrat) in entionisiertem Wasser und Zugabe des Inokulums (Dickstoffprobe aus der Papierfabrik 1) konnte erstmals ein visuell erkennbarer Biofilm auf den Stahlcoupons festgestellt werden. Aber die im Biofilm enthaltene Anzahl an NRB waren trotz einer Gesamtzellzahl von  $10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> und einer Koloniezahl von  $10^4$  KBE/cm<sup>2</sup> mit  $< 100$  MPN/cm<sup>2</sup> relativ niedrig, und die Nitratkonzentration blieb unverändert.

Aus diesen Ergebnissen ließ sich schließen, dass die Nährstoffsituation für die NRB im Batch-Reaktor zu ungünstig gewesen war, um sich innerhalb von 14 Tagen so vermehren zu können, dass das im Reaktor enthaltene Nitrat abgebaut werden konnte.

Um die Nährstoffbedingungen für das Wachstum von NRB zu verbessern, wurde eine kommerziell erhältliche Nitratbouillon getestet, die zum Nachweis von NRB verwendet wird. Bereits nach 24 Stunden war bei einem anfänglichen pH-Wert von pH 7 und bei 40 °C Reaktor-Temperatur der ursprüngliche Nitratgehalt (300 mg/L Nitrat) auf Konzentrationen unter 5 % der Ursprungskonzentration gesunken und im Biofilm konnten NRB mit  $1 \times 10^8$  MPN/cm<sup>2</sup> und in der wässrigen Phase mit  $2 \times 10^8$  MPN/mL nachgewiesen werden. Da die Gesamtzellzahl im Vergleich zur Anzahl NRB pro cm<sup>2</sup> nur um ca. eine Logstufe größer war, bedeutete dies, dass potenziell jedes zehnte Bakterium im Biofilm und in der wässrigen Phase in der Lage war, Nitrat reduzieren zu können. Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass die Wachstumsbedingungen für NRB in dieser Batch-Reaktor-Variante günstig waren und das Nitrat von den Mikroorganismen relativ schnell umgesetzt wurde.

Auffällig war bei den Batch-Reaktor-Versuchen der Einfluss der Aufbewahrungszeit des Inokulums im Tiefkühlschrank bei -78 °C auf die Abbaugeschwindigkeit des Nitrates. Mit zunehmender Lagerung des Inokulums im Tiefkühlschrank verringerte sich die Geschwindigkeit des Nitratabbaus. Parallel dazu verschob sich die Zunahme der Gesamtzellzahl hin zu längeren Versuchsdauern. Dies lässt vermuten, dass die Mikroorganismen im Inokulum durch den Aufenthalt im Tiefkühlschrank beeinträchtigt

worden waren. Dadurch konnten sie sich schlechter vermehren und schlechter Nitrat abbauen.

Die Zunahme der Gesamtzellzahl im Batch-Reaktor, die hohe Anzahl an NRB und der niedrige Restnitratgehalt von weniger als 5 % der Ursprungskonzentration nach 24 Stunden Versuchsdauer zeigen, dass eine Laborversuchsanordnung gefunden wurde, die den mikrobiellen Nitratabbau in der wässrigen Phase und im Biofilm ermöglichte. Bei dem Batch-Reaktor-System stehen prinzipiell Temperatur, Druck, pH-Wert, Salzgehalt (Chlorid, Sulfat, etc.), Nitratgehalt, Nitratquelle (Salze von: Na, K, Ca, Mg, Al, etc.), andere Stickstoffverbindungen ( $\text{NH}_4^+$  und  $\text{NO}_2^-$ ), Nährstoffgehalt (C, N, P, S, Spurenelemente), Kohlenstoffquelle (Methanol, Ethanol, Essigsäure, Cellulose, etc.), Sauerstoffgehalt und Redoxpotential als Parameter für eine gezielte Beeinflussung zur Verfügung. Da einige der hier aufgelisteten Parameter in der Praxis von Industriebetrieben nur schwierig beeinflusst werden können, bzw. durch die Verhältnisse in der Produktion vorgegeben sind, wurde für die Untersuchungen in dieser Arbeit eine Auswahl der zu variierenden Parameter getroffen.

Die Temperatur und der pH-Wert sind in der Praxis leicht zu messende und auch leicht zu steuernde Parameter für industrielle Wasserkreisläufe. Deshalb wurde der Einfluss dieser beiden Parameter untersucht. Da Wasserkreisläufe meist drucklos sind bzw. unter Atmosphärendruck stehen, wurde der Einfluss des Druckes auf das Batch-Reaktor-System nicht weiter untersucht. Der Chloridgehalt, als ein exemplarisches Beispiel für den Salzgehalt wurde ebenso untersucht wie der Einfluss der anfänglichen Nitratkonzentration und der Einfluss der Nitratquelle. Da diese drei Parameter auch alle durch die Zugabe von ANS beeinflusst werden, sind diese Untersuchungen ebenfalls von besonderer Bedeutung. Der Einfluss von anderen Stickstoffverbindungen ( $\text{NH}_4^+$  und  $\text{NO}_2^-$ ), des Nährstoffgehalts, der Kohlenstoffquelle, des Sauerstoffgehalts und des Redoxpotentials wurden nicht untersucht. Diese Parameter liegen in industriellen Wasserkreisläufen aufgrund des Produktions- oder Aufbereitungsprozesses individuell vor und wären nur mit aufwendigeren Maßnahmen zu steuern, wie z. B. durch Zudosierung eines weiteren chemischen Additivs, Belüftung, Zugabe eines Nährstoffes (C-Quelle) oder eines Mikrobiozides.

Um die Einflussfaktoren für den Nitratabbau in Bioreaktoren qualitativ und quantitativ zu untersuchen, wurde als Leitparameter der Nitratgehalt in den Batch-Reaktoren über die Versuchsdauer bestimmt. Durch die Gesamtzellzahl-Bestimmung in der Wasserphase und im Biofilm wurde der Einfluss auf die Mikroorganismen insgesamt, und durch MPN-Bestimmung für NRB der Einfluss auf die nitratreduzierenden Bakterien in der Wasserphase und im Biofilm analysiert.

### 5.3.1 Einfluss der Temperatur auf den Nitratabbau

Die Temperatur ist für mikrobielle Vorgänge einer der wichtigsten Einflussfaktoren. Da es eine Vielzahl von Mikroorganismen gibt, die bei unterschiedlichen Temperaturen optimal wachsen, teilt man sie je nach Temperaturoptimum in verschiedene Klassen ein (Abbildung 5.1).

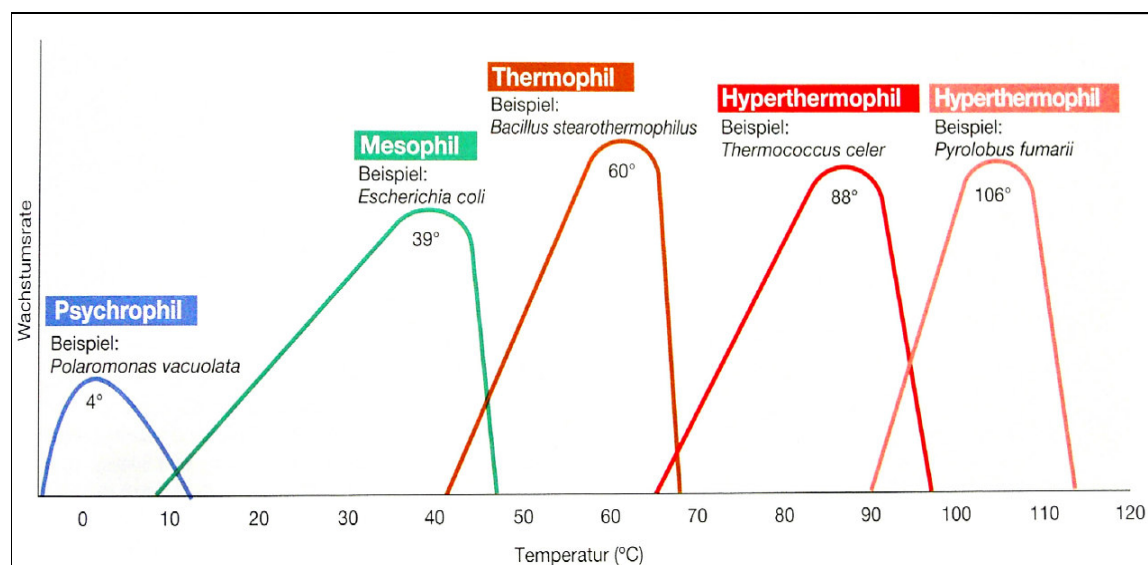


Abbildung 5.1: Einteilung von Mikroorganismen in Temperaturklassen (Madigan und Martinko, 2006).

In den Reaktorversuchen zum Einfluss der Temperatur auf den Nitratabbau wurde der Temperaturbereich von 10 °C – 50 °C untersucht, der den Praxisbedingungen in der Industrie entspricht und in dem mesophile Mikroorganismen vorherrschen sollten. Die Temperatur von ca. 35 °C im Wasserkreislauf der Papierfabrik 1, aus dem das Inokulum für die Reaktorversuche stammt, liegt relativ nah am Temperaturoptimum für mesophile Bakterien. Die Ergebnisse der Reaktorversuche zeigten innerhalb von 24 Stunden einen Nitratabbau über den gesamten Temperaturbereich von 10 °C – 40 °C. Bei einer Temperatur von 50 °C konnte unter den Versuchsbedingungen jedoch kein Nitratabbau festgestellt werden. Dies korreliert mit den Analysenergebnissen für die NRB, da im Falle des Reaktors, der bei einer Temperatur von 50 °C betrieben wurde, sowohl im Biofilm als auch im Wasser nur relativ geringe Konzentrationen < 100 MPN/mL bzw. cm<sup>2</sup> nachgewiesen wurden, obwohl eine Gesamtzellzahl von ca. 10<sup>6</sup> Zellen/mL bzw. cm<sup>2</sup> vorlag.

Innerhalb des Temperaturbereiches von 10 °C – 40 °C lag das Maximum für den Nitratabbau, die Gesamtzellzahl und die Anzahl NRB bei einer Temperatur von 40 °C. In den Biofilmproben aus den Reaktoren, die bei 40 °C inkubiert worden waren, wurden für die Gesamtzellzahl und die NRB ca. 10<sup>8</sup> Zellen bzw. MPN/cm<sup>2</sup>

nachgewiesen. In den entsprechenden Wasserproben wurden ca.  $10^9$  Zellen/mL für die Gesamtzellzahl und bis zu  $2 \times 10^{10}$  MPN/mL für die NRB bestimmt. Der maximale Abbau von Nitrat und die höchsten Zellzahlen wurden im Temperaturbereich von 20 °C – 40 °C gefunden, der für mesophile Bakterien charakteristisch ist (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Prozentualer Nitratabbau bezogen auf den Startwert, Anzahl der nitrat-reduzierenden Bakterien (NRB) und die Gesamtzellzahl (GZZ) in Wasser- und Biofilmprouben aus den Batch-Reaktoren nach 24 h in Abhängigkeit von der Reaktor-Temperatur. Der pH-Wert wurde zu Beginn der jeweiligen Versuche auf pH 7 eingestellt.

Temperatur im Reaktor	10 °C	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C
Nitratabbau [%]	93	70 – 95	70 – 99	85 – 99	0
NRB in der Wasserphase [MPN/mL]	$4 \times 10^5$	$2 \times 10^9$	$4 \times 10^7$ - $2 \times 10^8$	$4 \times 10^8$ - $2 \times 10^{10}$	$1 \times 10^2$
NRB im Biofilm [MPN/cm <sup>2</sup> ]	$7 \times 10^2$	$2 \times 10^5$ - $2 \times 10^6$	$1 \times 10^6$ - $7 \times 10^7$	$5 \times 10^6$ - $3 \times 10^8$	$3 \times 10^1$
GZZ in der Wasserphase [Zellen/mL]	$4 \times 10^7$	$1 \times 10^6$ - $2 \times 10^6$	$1 \times 10^8$ - $2 \times 10^8$	$4 \times 10^7$ - $1 \times 10^9$	$9 \times 10^7$
GZZ im Biofilm [Zellen/cm <sup>2</sup> ]	$3 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$	$1 \times 10^8$ - $9 \times 10^8$	$4 \times 10^6$

Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass bislang überwiegend Angaben für den Einfluss der Temperatur auf die Denitrifikation von Belebtschlamm oder Reinkulturen veröffentlicht worden sind und sich viele Ergebnisse auf die Denitrifikation im Boden beziehen. Amant und McCarty (1969) zeigten, dass Denitrifikation bei 12 °C mit einer signifikanten Nitratabbaurrate stattfand, aber unterhalb von 10 °C stark abnahm. Eine solche verminderte Nitratabbaurrate bei Temperaturen < 10 °C bestätigten Carrera et al. (2003) unter Verwendung von Belebtschlamm aus einer industriellen Kläranlage. Dawson und Murphy (1972) fanden bei Laboruntersuchungen zur Denitrifikation mit *Pseudomonas denitrificans*, dass die Denitrifikationsrate im Bereich von 5 °C – 27 °C einer Arrhenius-Gleichung folgte und exponentiell in diesem Temperaturbereich mit steigender Temperatur zunahm. Carrera et al. (2003) bestätigten diese Ergebnisse mit einem industriellen Klärschlamm und maximalen Abbauraten für die Denitrifikation bei 25 °C von 0,28 mg N/d-mg Glühverlust. Yatong

(1995) fand von 10 °C – 30 °C mit steigender Temperatur ebenfalls zunehmende Nitratabbauraten. Bremner und Shaw (1958) sowie Keeney et al. (1979) fanden dagegen eine deutlich höhere optimale Temperatur von 60 °C für den mikrobiellen Nitratabbau bei Laboruntersuchungen zur Denitrifikation mit unterschiedlichen Bodenproben.

### **5.3.2 Einfluss des pH-Wertes auf den Nitratabbau**

Für alle Mikroorganismen gibt es einen pH-Bereich in dem sie sich vermehren können und einen definierten pH-Wert bei dem sie optimal wachsen. Da viele unterschiedliche Mikroorganismen in der Lage sind Nitrat abzubauen, gibt es in der Literatur verschiedene Angaben zum pH-Bereich, in dem Denitrifikation stattfinden kann. Die veröffentlichten Ergebnisse beziehen sich jedoch meist auf natürliche Bodensysteme, Belebtschlämme aus Kläranlagen oder Laboruntersuchungen mit Reinkulturen und nicht auf Mischpopulationen in industriellen Wasserkreislaufsystemen.

Für die Anwendung in industriellen Wasserkreisläufen wurde in dieser Arbeit der pH-Bereich von pH 5 – pH 9 im Bezug auf den mikrobiellen Nitratabbau untersucht. Im Batch-Reaktor-System konnte durch den mikrobiellen Nitratabbau über den Versuchszeitraum erwartungsgemäß eine Erhöhung des pH-Wertes analog zu Gleichung 10 (Seite 29) festgestellt werden. Da jedoch die gemessenen pH-Wert-Erhöhungen innerhalb von 24 Stunden Versuchsdauer bis zu 2 pH-Einheiten betrugen, bestand die Möglichkeit, dass die vorhandenen Mikroorganismen durch den sich ändernden pH-Wert beeinflusst werden könnten. Aus diesem Grund wurden weitere Versuchsreihen im Batch-Reaktor mit Puffer-Systemen konzipiert, um konstante pH-Werte für die einzelnen Reaktoren zu gewährleisten. In diesen Versuchen zeigten die Batch-Reaktoren, die bei pH 7 betrieben wurden, die größte Nitratabbaugeschwindigkeit und die höchsten Gesamtzellzahlen bzw. Konzentrationen für NRB in den Wasserproben und auch im Biofilm. Bei den Reaktoren, die bei pH 5 und bei pH 9 betrieben worden waren, konnten nach 24 Stunden Versuchsdauer noch 30 % – 90 % des ursprünglichen Nitratgehaltes nachgewiesen werden, Nitrit wurde nach 24 Stunden in Konzentrationen > 20 mg/L detektiert und die ermittelten Zellzahlen waren besonders im Biofilm im Vergleich zu denen des pH 7 Reaktors um eine bis drei Logstufen geringer. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die im Inokulum enthaltenen Mikroorganismen bei den pH-Werten von pH 5 und pH 9 keine optimalen Wachstumsbedingungen vorfanden und nur begrenzt dazu in der Lage waren, Nitrat abzubauen.

Knowles (1982) veröffentlichte in einem Übersichtsartikel, dass das Optimum für die Denitrifikation zwischen pH 7 und pH 8 liegt, aber prinzipiell in einem pH-Bereich von pH 3,5 – pH 11 denitrifiziert werden kann. Seine Angaben bezogen sich auf Boden- und Abwasseruntersuchungen mit Belebtschlamm. Yatong (1995) bestätigte diese Angaben durch eigene Untersuchungen mit Mischpopulationen im Abwasserbereich. Er fand die höchste Abbaurate für Nitrat bei einem pH-Wert von pH 7,5 und sinkende Nitrat-Abbauraten sowohl bei steigendem als auch bei sinkendem pH-Wert mit parallel auftretender Nitrit-Anhäufung. Beccari et al. (1983) stellten anhand von Abwasseruntersuchungen unter kontrollierten Bedingungen im Labor fest, dass die verwendeten Mischkulturen in Batch-Reaktoren eine maximale Nitratabbaurate bei 25 °C und einem pH-Wert von pH 7,5 aufwiesen. Glass und Silverstein (1998) zeigten im Gegensatz dazu, dass bei Belebtschlamm-Untersuchungen in stark nitrathaltigem Abwasser bei pH-Werten von pH 6,5 und pH 7 kein Nitrat abgebaut werden konnte, aber ab pH 7,5 bis zu pH 9,0 Nitrat mit zunehmender Geschwindigkeit abgebaut und zeitgleich Nitrit akkumuliert wurde. Bremner und Shaw (1958) zeigten bei Untersuchungen zur Denitrifikation im Boden, dass bei pH-Werten zwischen pH 7 und pH 8 der Nitratabbau nahezu vollständig war, bei pH 5,8 ca. 70 % und bei einem pH-Wert von 4,1 bzw. pH 3,8 nur < 10 % des vorhandenen Nitrates abgebaut wurden.

### **5.3.3 Einfluss des Salzgehaltes auf den Nitratabbau**

In geschlossenen Wasserkreisläufen liegen meist hohe Salzgehalte vor. Ob hiervon der Nitratabbau beeinflusst werden kann, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Durch Verwendung von Natriumchlorid wurde ein Chloridgehalt von 100 mg/L – 3.500 mg/L und ein Bereich der Leitfähigkeit von 1 mS/cm – 10 mS/cm mit dem Batch-Reaktor-System untersucht.

Bei den Untersuchungen konnte kein Einfluss des Salzgehaltes auf den Nitratabbau festgestellt werden, denn alle Ansätze mit unterschiedlichen Chloridkonzentrationen zeigten nach 24 Stunden einen vollständigen Nitratabbau und ähnliche Konzentrationen für die Gesamtzellzahl und NRB in Biofilm und Wasserproben. Zu der gleichen Erkenntnis kamen Magalhaes et al. (2005) durch ihre Untersuchungen an küstennahen Sedimenten und Biofilmen von Flussgestein. Auch sie konnten keinen Einfluss des Salzgehaltes auf die Denitrifikation nachweisen. Ucisik und Henze (2004) zeigten anhand ihrer Laboruntersuchungen zum biologischen Nitratabbau von synthetischen Abwässern aus der Düngemittelindustrie, dass für Chloridkonzentrationen von 4.800 mg/L bis 96.700 mg/L ein Nitratabbau stattfindet, aber die Nitratabbaugeschwindigkeit mit steigender Chloridkonzentration negativ



beeinflusst wird. Ein Vergleich der Ergebnisse aus den Untersuchungen von Ucisik und Henze (2004) mit Ergebnissen aus Laboruntersuchungen von Henze et al. (2001) mit häuslichem Abwasser, das deutlich weniger Chlorid enthält ( $<< 1.000 \text{ mg/L}$ ), ergab eine Verringerung der spezifischen Umsatzrate für den Nitratabbau um eine Logstufe.

#### **5.3.4 Einfluss des Nitratgehaltes auf den Nitratabbau**

Neben Einflussgrößen wie der Temperatur oder dem pH-Wert ist auch die Nitratkonzentration von entscheidender Bedeutung für den mikrobiellen Nitratabbau in wässrigen Systemen. Im ersten Schritt der dissimilativen Nitratreduktion wird Nitrat durch das Enzym Nitratreduktase zu Nitrit reduziert. Die Synthese dieses Enzyms wird durch die Anwesenheit von Nitrat induziert, aber durch molekularen Sauerstoff unterdrückt (Körner und Zumft, 1989; Madigan und Martinko, 2006).

Da sich der Nitratgehalt in Wasserkreislaufsystemen durch den Nitratanteil im ANS erhöht, sollte dies im Laborversuch nachgestellt werden und mit einem Nitratabbau im Batch-Reaktor ohne zusätzliche Dosierung von ANS verglichen werden. Nach einer praxisrelevanten Dosierung von  $300 \text{ mg/L}$  ANS konnten nach 24 Stunden Versuchsdauer im Hinblick auf die Gesamtzellzahl und die Anzahl NRB sowohl in der Wasserphase als auch im Biofilm keine Unterschiede im Vergleich zum Versuchsansatz ohne Dosierung von ANS festgestellt werden.

Die Nitratkonzentration war nach 24 Stunden Versuchsdauer im Reaktor ohne zusätzliche Dosierung von ANS bis auf 49 % des ursprünglich vorhandenen Nitratgehaltes abgebaut, während im Reaktor mit Dosierung von  $300 \text{ mg/L}$  ANS schon 81 % Nitrat abgebaut worden war. Nach 48 Stunden Versuchsdauer war das enthaltene Nitrat in beiden Reaktoren nahezu vollständig abgebaut. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der höhere anfängliche Nitratgehalt eine höhere Umsatzrate hervorgerufen haben könnte. Einen solchen Einfluss der anfänglichen Nitratkonzentration auf die Nitratabbaurate fanden Koike et al. (1972) in ihren Untersuchungen zur Denitrifikation in einem offenen Gewässer. Anhand massenspektrometrischer Untersuchungen mit  $^{15}\text{N}$ -Isotopen wiesen sie mit zunehmender anfänglicher Nitratkonzentration sowohl eine steigende Nitrit-Produktion als auch eine steigende Denitrifikationsrate nach. Balakrishnan und Eckenfelder (1969) fanden bei Untersuchungen mit Belebtschlamm einen Zusammenhang zwischen der anfänglichen Nitratkonzentration und dem Abbau von Nitrat. Sie zeigten, dass bei Überschuss einer organischen Kohlenstoff-Quelle die Denitrifikationsrate als eine Funktion der Ausgangskonzentration an Nitrat zunahm.

Sie ermittelten bei einer Ausgangskonzentration von 50 mg/L  $\text{NO}_3\text{-N}$  eine Denitrifikationsrate von  $< 5 \text{ mg NO}_3\text{-N h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  Trockenrückstand (TR) während bei einer Konzentration zu Beginn des Versuches von 250 mg/L  $\text{NO}_3\text{-N}$  eine Denitrifikationsrate von  $> 10 \text{ mg NO}_3\text{-N h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  TR erhalten wurde. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Salem et al. (2007) bei ihren Laboruntersuchungen zur Denitrifikation von nitratbelastetem Grundwasser mit Pflanzenresten aus der Olivenölproduktion. Die Autoren wiesen mit zunehmender anfänglicher Nitratkonzentration von 100 – 500 mg/L  $\text{NO}_3\text{-N}$  eine steigende Denitrifikationsrate nach. Pekdemir et al. (1998) kamen bei Untersuchungen zur Denitrifikation von nitratbelastetem Grundwasser zu der gleichen Erkenntnis. Sie fanden mit steigender anfänglicher Nitratkonzentration auch eine steigende Nitratabbaurrate bei ihren Untersuchungen im Labor mit Hilfe von Bioreaktoren auf Basis von Aktivkohle. Bei Untersuchungen zur Denitrifikation im Boden bestätigte Ryzhova (1979) die Abhängigkeit der Denitrifikationsrate von der anfänglichen Nitratkonzentration in einem Konzentrationsbereich bis zu 500 mg/L  $\text{NO}_3\text{-N}$ . Bei höheren anfänglichen Nitratgehalten von  $> 700 \text{ mg/L NO}_3\text{-N}$  wiesen die Autoren nach, dass die Denitrifikationsrate unabhängig von der Nitratkonzentration zu Beginn des Versuches war.

Der Versuch mit drei unterschiedlichen Dosiermengen ANS zeigte bei den beiden niedrigen Dosiermengen von 100 ppm und 200 ppm nach 24 Stunden Versuchsdauer einen vollständigen Nitratabbau mit vergleichbarer Anzahl NRB und Gesamtzellzahl im Biofilm und in der Wasserphase. Der Reaktor mit einer Dosierung von 900 ppm ANS zeigte dagegen bereits zu Beginn des Versuches eine deutlich niedrigere Anzahl an NRB in der Wasserphase, die innerhalb von 24 Stunden Versuchsdauer sogar noch abnahm. Die Ergebnisse der Gesamtzellzahlbestimmung in der Wasserphase blieben dagegen innerhalb einer Versuchsdauer von 24 Stunden unverändert. In der Biofilmprobe wurde eine um zwei Logstufen niedrigere Gesamtzellzahl bestimmt und es wurden NRB mit nur 29 MPN/cm<sup>2</sup> Couponoberfläche nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Dosierung von 900 ppm unter den Versuchsbedingungen zu keinem Nitratabbau geführt hat und die Anzahl an nitratreduzierenden Mikroorganismen in der Wasserphase und besonders im Biofilm negativ beeinflusst worden war. Ob das mangelhafte Wachstum der NRB durch die pH-Wert Absenkung des sauren ANS von pH 6,6 auf pH 5,3 oder durch die Koagulationswirkung des ANS verursacht wurde, konnte durch diese Untersuchungen nicht aufgeklärt werden. Aufgrund der Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Einfluss des pH-Wertes ist jedoch zu vermuten, dass der niedrige pH-Wert die Wachstumsbedingungen der NRB negativ beeinflusst hat.

### 5.3.5 Einfluss der Nitratquelle auf den Nitratabbau

Die Anwendung von ANS in Wasserkreisläufen beeinflusst nicht nur die Konzentration von Nitrat, sondern es wird auch eine Zugabe von Aluminium mit dem Ziel der Koagulation durchgeführt. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob unter Laborbedingungen das Kation des zugegebenen Nitratsalzes einen Einfluss auf den mikrobiellen Nitratabbau ausübt.

In den Laborversuchen wurde ANS im Vergleich zu Natriumnitrat und Calciumnitrat getestet und so zugegeben, dass zu Beginn der Versuche in allen Ansätzen die gleiche Nitratkonzentration vorhanden war. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte für Natriumnitrat und Calciumnitrat eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse im Hinblick auf die Gesamtzellzahl, die Anzahl NRB, den pH-Wert, den Sauerstoffgehalt und das Redoxpotential gefunden werden. Der Nitratabbau war innerhalb von 24 Stunden in allen Ansätzen mit Calcium- bzw. Natriumnitrat auf > 80 % der ursprünglichen Nitratkonzentration vorangeschritten. Dagegen zeigten die Ansätze mit ANS nach 24 Stunden noch keinen nachweisbaren Nitratabbau, sowie deutliche Unterschiede bei der Gesamtzellzahl, der Anzahl NRB, dem pH-Wert, dem Sauerstoffgehalt und dem Redoxpotential, denn oxidierende Verhältnisse wurden nach Dosierung von ANS deutlich länger aufrechterhalten. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass nach Zugabe von ANS ein verzögerter Nitratabbau stattfand. Mögliche Gründe dafür könnten z. B. die pH-Wert-Verschiebung nach Zudosierung des sauren ANS sein oder die koagulierende Wirkung des ANS, die zu einer Beeinträchtigung der mikrobiellen Aktivität führte. Bei einem Vergleich der Ergebnisse aus den Versuchen mit unterschiedlichen Nitratquellen und den Ergebnissen aus den vorherigen Versuchen zum unterschiedlichen Nitratgehalt lässt sich vermuten, dass es auch hier zu einer Überdosierung von ANS bei 900 ppm Zugabemenge gekommen sein könnte und dadurch der pH-Wert in einen für den mikrobiellen Nitratabbau ungünstigen Bereich verschoben wurde.

Bremner und Shaw (1958) wiesen anhand von Laboruntersuchungen zur Denitrifikation im Boden nach, dass der mikrobielle Nitratabbau von Kalium-, Calcium-, Natrium- und Strontiumnitrat bei 25 °C mit der gleichen Abbaugeschwindigkeit verläuft. Eine erhöhte Denitrifikationsrate wurde dagegen bei Verwendung von Ammoniumnitrat festgestellt. Ein Aluminiumnitrat oder Aluminiumnitratsulfat wurde in den Untersuchungen von Bremner und Shaw (1958) nicht getestet.

## 5.4 Charakterisierung der beteiligten Mikroorganismen

Zur Charakterisierung von nitratreduzierenden Bakterien, wurden in ausgewählten Reaktorläufen exemplarisch Untersuchungen durchgeführt. Die Proben dazu stammten von Biofilm- und Wasserproben aus den Reaktoren zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf den Nitratabbau (Kap. 4.6.1) und aus Reaktoren mit bzw. ohne Dosierung von Aluminiumnitratsulfat (Kap. 4.6.4). Das Inokulum der ausgewählten Batch-Reaktoren stammte in allen Fällen aus der Papierfabrik 1.

Viele Gram-negative Isolate konnten bis zur Gattung bzw. Art identifiziert werden. Die meisten der identifizierten Mikroorganismen sind gemäß der angegebenen Literatur in der Lage, Nitrat zu reduzieren (Tabelle 4.17) und wurden auch von anderen Autoren in Biofilm- bzw. Wasserproben von Papierfabriken nachgewiesen (Klahre et al., 1997; Gauthier und Archibald, 2000). Klahre et al. (1997) fassten zusammen, dass Mikroorganismen in Wasser- und Biofilmproben von Papierfabriken gefunden wurden, die den Gattungen *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* und *Bacillus* angehörten. Gauthier und Archibald (2000) veröffentlichten Ergebnisse von Untersuchungen in sieben verschiedenen kanadischen Papierfabriken bei denen Mikroorganismen der Gattungen *Enterobacter*, *Citrobacter* und *Klebsiella* nachgewiesen wurden.

Bei den Gram-positiven Isolaten aus den Reaktoren mit und ohne Zugabe von ANS handelte es sich hauptsächlich um große stäbchenförmige Bakterien. Zwei Isolate aus den Reaktoren dieser Arbeit konnten als der Gattung *Bacillus* zugehörig identifiziert werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Suihko et al. (2004) bei Untersuchungen von Wasser-, Biofilm- und Stoffproben aus vier verschiedenen finnischen Papierfabriken. Sie wiesen zahlreiche aerobe, mesophile Sporenbildner und thermophile Bakterien der Gattung *Bacillus* in ihren Isolaten nach. Klahre et al. (1996) veröffentlichten, dass Mikroorganismen der Gattungen *Pseudomonas*, *Klebsiella* und *Bacillus* in Wassersystemen von Papierfabriken gefunden wurden und für Probleme bei der Papierfabrikation (Schleimbildung und Geruchsbildung) verantwortlich gemacht werden können. Babenko (2006) wies bei ihren Untersuchungen an Wasser- und Biofilmproben in einer Papierfabrik für Zeitungsdruckpapier überwiegend Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae* nach. Mehrheitlich konnten ihre Isolate den Gattungen *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* und *Klebsiella* zugeordnet werden. Zwei Vertreter dieser Gattungen, *Enterobacter cloacae* und *Klebsiella pneumoniae* konnten in allen Proben des Wasserkreislaufsystems (Cleanerwasser, Frischwasser und Cleanerbeckenbiofilm) nachgewiesen werden. In den Biofilmpfropfen fand Babenko (2006) im Vergleich zu Wasserproben deutlich höhere Konzentrationen von *Pseudomonas aeruginosa*.

Auch im Falle der Isolate aus den Reaktoren zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit für die mikrobielle Nitratreduktion aus dieser Arbeit konnte mehrmals *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert werden.

Fasst man die Ergebnisse der Charakterisierung der Isolate aus den untersuchten Reaktoren zusammen, so weisen diese darauf hin, dass die hier identifizierten Bakterien an der beobachteten Nitratreduktion sowohl im Laborversuch als auch in der Papierfabrik 1 beteiligt sind. Außerdem wurden auch in den Systemen ohne ANS-Zugabe Isolate gefunden, welche laut Literatur zum Nitratabbau befähigt sind. In den untersuchten industriellen Wassersystemen scheinen daher generell die Voraussetzungen für einen mikrobiellen Nitratabbau gegeben zu sein.

## **5.5 Schlussfolgerungen**

Im Falle von drei der vier untersuchten industriellen Wasserkreisläufe konnte nach der Zudosierung von Aluminiumnitratsulfat (ANS) eine Abnahme der Nitratkonzentration nachgewiesen werden. Parallel dazu wurden zeitweilig erhöhte Nitritkonzentrationen beobachtet. Nitratreduzierende Bakterien (NRB), die in der Lage sind, Nitrat als Nährstoff zu verwerten, wurden in Biofilm- und Wasserproben aus allen vier Industriebetrieben nachgewiesen. Die Konzentrationen an NRB waren im metallverarbeitenden Betrieb, bei dem es zu keiner Abnahme der Nitratkonzentration nach Zudosierung von ANS gekommen war, im Vergleich zu den übrigen drei Industriebetrieben deutlich geringer.

Es wurde exemplarisch gezeigt, dass es sich bei der Abnahme der Nitratkonzentration im Wasserkreislauf der Papierfabrik 1 um ein mikrobiologisches Phänomen handelt und sowohl die Mikroorganismen in der Wasserphase als auch Mikroorganismen im Biofilm einen Beitrag zum Nitratabbau leisten. Eine Beteiligung von einzeln suspendierten Bakterienzellen am Nitratabbau ist wenig wahrscheinlich, da in den betroffenen Wasserkreisläufen meist Sauerstoffgehalte  $> 2 \text{ mg/L O}_2$  vorhanden waren und eine Denitrifikation erst unter anoxischen Bedingungen stattfindet (Madigan und Martinko, 2006). Da in Wasserkreisläufen von Papierfabriken relativ hohe Mengen an Zellulosefasern enthalten sind, entstehen durch gegenseitiges Verknäueln dieser Fasern Agglomerate, die im Bezug auf ihre Größe mit Belebtschlammflocken vergleichbar sind. Aufgrund der relativ guten Nährstoffbedingungen in Wassersystemen von Papierfabriken findet eine mikrobielle Besiedlung dieser Agglomerate statt und es entstehen „schwimmende Biofilme“ im Wasserkreislauf (Klahre et al., 1996; Babenko, 2006). Da die bevorzugte Lebensstrategie von Bakterien im Ausbilden von Biofilmen liegt (Flemming, 2008), dürften

NRB sowohl immobilisiert auf festen Oberflächen (Rohre, Behälter) als auch in schwimmenden Agglomeraten (Wasserphase) für die nachgewiesene Abnahme der Nitratkonzentration in den drei Industriebetrieben verantwortlich sein.

Bei der Charakterisierung von Mikroorganismen aus Wasser- und Biofilmproben der Papierfabrik 1 konnten Bakterien der Gattungen *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* und *Bacillus* identifiziert werden. Das Vorkommen dieser Gattungen in Wasserkreisläufen von Papierfabriken konnte anhand der Literatur von mehreren Autoren bestätigt werden (Klahre et al., 1997; Suihko et al., 2004; Babenko, 2006). Potentiell sind die identifizierten Mikroorganismen in der Lage, Nitrat zu reduzieren (Knowles, 1982; Kerschen et al., 2001; Brenner und Farmer, 2005), so dass die Vermutung nahe liegt, dass diese Bakterien am nachgewiesenen mikrobiellen Nitratabbau beteiligt waren.

Im Labor durchgeführte Untersuchungen mit Batch-Reaktoren und einem Inokulum aus der Papierfabrik 1 zeigten, dass Temperatur, pH-Wert, Nitratmenge und Nitratquelle den mikrobiellen Nitratabbau in Wasserkreislaufsystemen beeinflussen können, während für den Salzgehalt im Konzentrationsbereich von 100 mg/L – 3.500 mg/L Chlorid kein Einfluss auf den mikrobiellen Nitratabbau nachgewiesen werden konnte. Diese Werte für den Chloridgehalt entsprechen einer Leitfähigkeit von 1 mS/cm – 10 mS/cm.

In einem Temperaturbereich von 10 °C – 40 °C nahmen unter den ausgewählten Bedingungen im Batch-Reaktor der Nitratabbau, die Gesamtzellzahl und die Anzahl der NRB mit steigender Temperatur zu, bei 50 °C konnte kein Nitratabbau mehr nachgewiesen werden, dies korrelierte mit sehr niedrigen Konzentrationen für NRB im Wasser und im Biofilm.

Die Ergebnisse der Laboruntersuchungen zum Einfluss des pH-Wertes auf den mikrobiellen Nitratabbau zeigen bei pH-Werten von pH 5 und pH 9 keine optimalen Wachstumsbedingungen und nur einen begrenzten Nitratabbau. Die ermittelten Zellzahlen waren besonders im Biofilm im Vergleich zu denen des Reaktors, der auf pH 7 eingestellt war, um eine bis drei Logstufen geringer gewesen.

Auch der anfängliche Nitratgehalt beeinflusst den mikrobiellen Nitratabbau. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass unter den Bedingungen im Batch-Reaktor mit steigendem anfänglichem Nitratgehalt eine höhere Umsatzrate für den mikrobiellen Nitratabbau erreicht wird. Eine zu hohe Dosierung (900 ppm ANS) brachte unter den Versuchsbedingungen den Nitratabbau zum Erliegen und die Anzahl an NRB in der Wasserphase und besonders im Biofilm wurde negativ beeinflusst. Dieser Effekt ist

vermutlich auf die pH absenkende Wirkung des sauren ANS bei hoher Dosierung zurückzuführen.

Die Ergebnisse im Hinblick auf den mikrobiellen Nitratabbau nach Zudosierung unterschiedlicher Nitratsalze zeigten für Natriumnitrat und Calciumnitrat keine Unterschiede im Hinblick auf die Gesamtzellzahl, die Anzahl NRB, den pH-Wert, den Sauerstoffgehalt und das Redoxpotential. Wurde allerdings die gleiche Nitratkonzentration als ANS zugegeben, so ergab sich ein verzögerter Nitratabbau, sowie deutliche Unterschiede bei der Gesamtzellzahl, der Anzahl NRB, dem pH-Wert, dem Sauerstoffgehalt und dem Redoxpotential. Oxidierende Verhältnisse wurden nach Dosierung von ANS deutlich länger aufrechterhalten.

Mit Hilfe der hier untersuchten Parameter lassen sich die Bedingungen für den mikrobiellen Nitratabbau in industriellen Wassersystemen steuern. Im günstigsten Fall kann nach der Dosierung von ANS der gesamte Nitratanteil durch die im Wasserkreislaufsystem enthaltenen Mikroorganismen verstoffwechselt werden und es kann keine Aufsalzung mehr stattfinden (Abbildung 5.2).

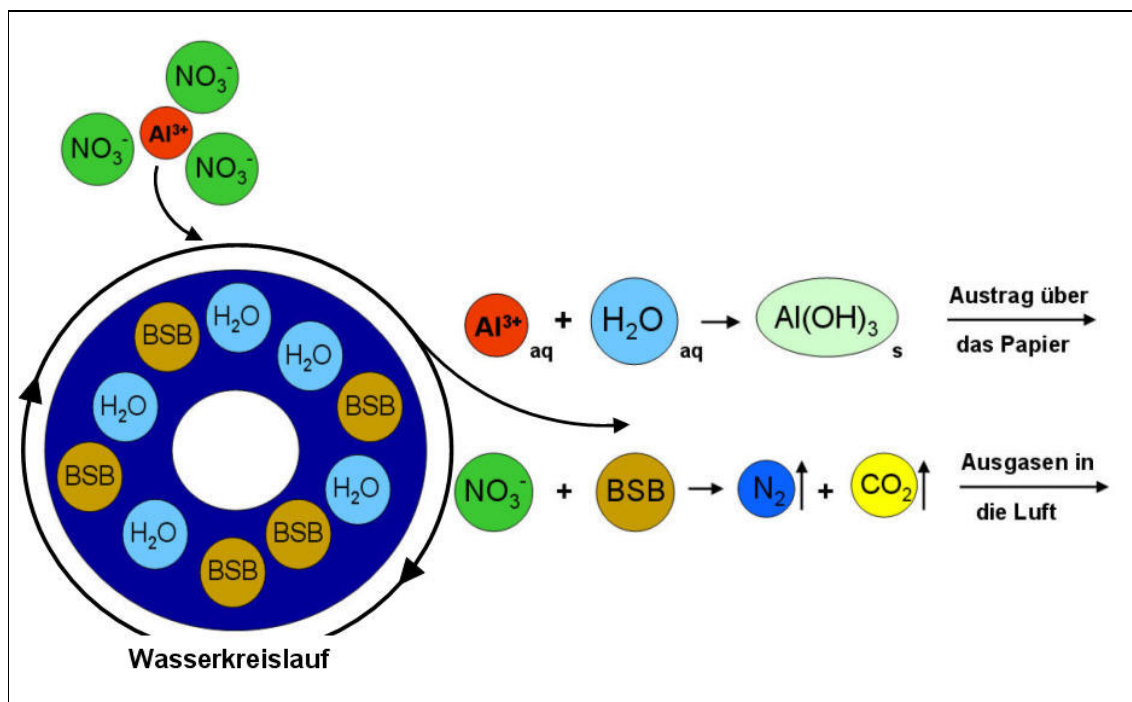


Abbildung 5.2 Schematische Darstellung der Anwendung von Aluminiumnitratsulfat in einem Wasserkreislauf der Papierherstellung mit anschließender Denitrifikation. BSB: Biologischer Sauerstoffbedarf.

In Abbildung 5.2 ist ersichtlich, dass bei der Denitrifikation auch organischer Kohlenstoff umgesetzt wird. Der Bedarf an Kohlenstoff für die Denitrifikation beträgt

ca. 5 kg CSB pro kg zu denitrifizierendem Nitratstickstoff (ATV-DVWK-A 131, 2000). Carerra et al. (2003) veröffentlichte für eine vollständige Denitrifikation in Kläranlagen mit getrennten Becken für die Nitrifikation und Denitrifikation ein CSB/N Verhältnis von  $3.7 \pm 0.9$  mg CSB / mg N. Das bedeutet durch die NRB werden als CSB 500 mg/L O<sub>2</sub> für 100 mg/L Nitrat-N umgesetzt.

## 5.6 Ausblick

Die Ergebnisse der Untersuchungen aus dieser Arbeit lassen auf einen mikrobiellen Nitratabbau direkt im Wasserkreislauf von industriellen Produktionsbetrieben schließen. Im Fall der Verwendung von Aluminiumnitratsalzen anstelle von Aluminiumsulfat- oder Aluminiumchloridsalzen als Koagulant, sollten sich deshalb anorganische Salze in Wasserkreisläufen deutlich weniger aufkonzentrieren. Durch die verringerte Aufsalzung könnte das Wasser öfter wieder verwendet werden, was zu einer weiteren Schließung von Wasserkreisläufen führt. Auf diese Weise müsste weniger Frischwasser in Industriebetrieben eingesetzt werden und es fiele weniger Abwasser zur Entsorgung an. Diese beiden Folgeerscheinungen würden die Umweltbelastung verringern und Kosten für die Produktion könnten gesenkt werden. Ein weiterer Vorteil für den Industriebetrieb wäre die Verringerung der Konzentration an BSB im Wasserkreislauf durch die heterotrophe Denitrifikation. Da die Nitratatmung, thermodynamisch betrachtet, für die Mikroorganismen günstiger ist, wird die Sulfatatmung benachteiligt (Madigan und Martinko, 2006). Auf diese Weise kann der Entstehung von Schwefelwasserstoff durch sulfatreduzierende Bakterien vorgebeugt werden und die Geruchsbelastung in Industriebetrieben kann verringert oder sogar beseitigt werden.

Ein unkontrollierter Nitratabbau direkt im industriellen Wasserkreislauf birgt aber auch Risiken. Zum einen könnte es durch die Vermehrung von nitratreduzierenden Mikroorganismen zu einer erhöhten Bakterienkonzentration im Wasserkreislauf oder verstärkter Biofilmbildung kommen. Zum anderen könnte die Entwicklung von größeren Mengen gasförmigem Stickstoff oder anderen gasförmigen Stickoxiden, die bei der Denitrifikation als Zwischenstufen auftreten, Probleme hervorrufen, wie z. B. die Entstehung von Gasblasen an erhöhten Stellen in Rohrleitungen. Als eine Konsequenz bei unvollständiger Denitrifikation könnten erhöhte Konzentrationen an Nitrit in Wasserkreisläufen vorkommen, was gesundheitlich nicht unbedenklich wäre. Alle der hier genannten Risiken könnten bei genügender Kenntnis und ausreichender Kontrolle der Denitrifikation verhindert werden. Hierzu bedarf es jedoch weitergehender Forschung bezüglich der direkten mikrobiellen Nitratreduktion in Wasserkreisläufen von Industriebetrieben mit dem Ziel eine möglichst vollständige



Denitrifikation zu erreichen, die zu keinerlei Nachteilen im Produktionsbetrieb führt. Ein zweiter Ansatz wäre das zugegebene Nitrat nicht direkt im Wasserkreislauf der Produktion zu denitrifizieren, sondern in nachgeschalteten Kläranlagen oder Bioreaktoren, die im Bypass zur Produktion arbeiten, um im Anschluss das vom Nitrat-Stickstoff befreite Wasser wieder in die Produktion zurückführen zu können. Diese beiden Ansätze hätten den Vorteil, dass z. B. bei unzureichendem Nährstoffverhältnissen, die fehlenden Komponenten separat zugegeben werden könnten um eine optimale Denitrifikation zu gewährleisten.

Die Verwendung von Nitratsalzen in industriellen Wasserkreisläufen könnte sich in der Zukunft nicht nur auf den Einsatz von Aluminiumnitrat oder Aluminiumnitratsulfat beschränken, sondern es wäre denkbar, dass soweit als möglich, alle organischen oder anorganischen chemischen Additive Nitrat als Anion enthalten. Das eingetragene Nitrat könnte dann im Wasserkreislauf oder in einer nachgeschalteten Kläranlage denitrifiziert werden und würde auf diese Weise in gasförmigen Stickstoff umgewandelt werden. Durch eine solche Vorgehensweise könnte der Eintrag von anorganischen Inhaltsstoffen in die Gewässer erheblich gesenkt und damit die Belastung der Umwelt verringert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- AbwV (2004). *Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung - AbwV)*. BGBl. I Nr. 28, 1108, 2625.
- Amant, P. S., McCarty, P. L. (1969). Treatment of high nitrate waters. *A. Water St. Ass. J.* **61**: 659-662.
- ATV-DVWK-A 131 (2000). *Bemessung von einstufigen Belebungsanlagen*. GFA, Hennef.
- Babenko, O. (2006). Nachweis von coliformen Bakterien und *Pseudomonas aeruginosa* in einem Wassersystem der Papierherstellung. *Bachelor-Arbeit, Fachbereich Chemie*. Universität Duisburg-Essen, Duisburg.
- Bache, D. H., Gregory, R. (2007). *Flocs in water treatment*. IWA Publishing, London.
- Balakrishnan, S., Eckenfelder, W. W. (1969). Nitrogen relationships in biological treatment processes. III. Denitrification in the modified activated sludge process. *Water Res.* **3**: 177-188.
- Beauchamp, E. G., Trevorst, J. T., Paul, J. W. (1989). Carbon Sources for bacterial denitrification. *Adv. Soil Sci.* **10**: 113-142.
- Beccari, M., Passino, R., Ramadori, R., Tandoi, V. (1983). Kinetics of dissimilatory nitrate and nitrite reductase in suspended growth culture. *J. Water Pollut. Con. F.* **55**: 58-63.
- Bertsch, P. M., Thomas, G. W., Barnhisel, R. I. (1986). Characterization of hydroxy-aluminium solutions by aluminium-27 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **50**: 825-830.
- Betlach, M. R., Tiedje, J. M. (1981). Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 1074-1084.
- Bobek, B., Hamm, U., Schabel, S. (2005). Anaerobe Behandlung von Abwässern der Papierindustrie mit thermophilen Mikroorganismen. *Das Papier* **7**: 50-57.
- Bos, J. H., Veenstra, P., Verhoeven, H., de Vos, P. D. (1999). *Das Papierbuch. Handbuch der Papierherstellung*. EPN Verlag, Houten, Niederlande.
- Bratby, J. (2006). *Coagulation and Flocculation in Water and Wastewater Treatment*. IWA Publishing, London, Seattle.
- Brecht, W., Dalpke, H.-L. (1980). *Wasser, Abwasser, Abwassereinigung in der Papierindustrie*. Günter-Staib Verlag, Biberach.
- Bremner, J. M., Shaw, K. (1958). Denitrification in soil II. Factors affecting denitrification. *J. Agric. Sci.* **51**: 40-52.
- Brenner, D. J., Farmer, J. J. (2005). Order XIII. "Enterobacteriales". In: *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. (eds.). Springer, New York, S. 587-607.
- Buesing, N., Gessner, M. O. (2002). Comparison of detachment procedures for direct counts of bacteria associated with sediment particles, plant litter and epiphytic biofilms. *Aquat. Microb. Ecol.* **27**: 29-36.
- Buffle, J., Leppard, G. G. (1995). Characterization of aquatic colloids and macromolecules. *Environ. Sci. Technol.* **29**: 2169-2175.
- Bülow, C., Pingen, G., Hamm, U. (2003). Schließung des Wasserkreislaufs einer Altpapier verarbeitenden Papierfabrik unter besonderer Berücksichtigung der Calcium-Problematik. *Das Papier* **1**: 31-38.
- Capdepon, A., Hilbert, H., Künzel, U., Scordialo, A. (2002). Betriebserfahrungen mit Aluminiumnitrat (AN). *Wochenbl. Papierfabr.* **130**: 553-556.

- Carrera, J., Vicent, T., Lafuente, F. J. (2003). Influence of temperature on denitrification of an industrial high-strength nitrogen wastewater in a two-sludge system. *Water SA* **29**: 11-16.
- Christensen, B. E., Characklis, W. G. (1990). Physical and chemical properties of biofilms. In: *Biofilms*. Characklis, W. G., Marshall, K. C. (eds.). John Wiley, New York, S. 93-130.
- Claus, D., Berkeley, R. C. W. (1986). The genus *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. (eds.). Springer, New York, S. 1105–1139.
- Claus, G., Müller, R. (1996). Biofilms in a paper mill process water system. In: *Microbially Influenced corrosion of materials*. Heitz, E., Flemming, H.-C., Sand, W. (eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, S. 429-437.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial Biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.* **49**: 711 - 745.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* **176**: 2137 - 2142.
- Croue, J. P., Benjamin, M. M., Korshin, G. V. (1999). *Characterization of Natural Organic Matter in Drinking Water*. AWWA, Denver.
- Dalpe, H.-L. (1999). Warum Kreisläufe? *Wochenbl. Papierfabr.* **3**: 135-136.
- Daum, J. (2002). Untersuchungen zu Reaktionsverlauf und Kinetik der katalytischen Nitratreduktion. *Dissertation, Gemeinsame Naturwissenschaftliche Fakultät*. Technische Universität Carolo Wilhelmina, Braunschweig.
- Dawson, R. N., Murphy, K. L. (1972). The temperature dependancy of biological denitrification. *Water Res.* **6**: 71-83.
- Demel, I., Kappen, J. (1999). Verfahrenstechnik und Optimierung von Wasserkreisläufen. *Wochenbl. Papierfabr.* **3**: 141-145.
- DFG MAK-Liste (2007). *MAK- und BAT-Werte-Liste 2007, Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 43*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Dietz, W., Mannert, C., Bierbaum, S., Schramm, S. (2006). Abwasserfreie Erzeugung von weiß gedeckten Wellpappenrohropapieren ohne Qualitäts- und Produktivitätsverlust. *PTS-Forschungsbericht*. München.
- DIN 38404-3 (2005). *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C) - Teil 3: Bestimmung der Absorption im Bereich der UV-Strahlung, Spektraler Absorptionskoeffizient (C 3)*. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN 38405 Teil 29 (1994). *Photometrische Bestimmung von Nitrat mit Sulfosalizylsäure*. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN 38409 H41 (1980). *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H); Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) im Bereich über 15 mg/l (H 41)*. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN 1484 (1997). *Wasseranalytik - Anleitungen zur Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC) und des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC)*. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN 12879 (2001). *Bestimmung des Glühverlustes der Trockenmasse*. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN 12880 (2001). *Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehaltes*. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN 26777 (1993). *DIN EN 26777: Wasserbeschaffenheit; Bestimmung von Nitrit; Spektrometrisches Verfahren*. Beuth Verlag, Berlin.

- DIN EN ISO 7027 (2000). *Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Trübung*. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN ISO 15705 (2003). *Wasserbeschaffenheit - Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (ST-CSB) - Küvettentest*. Beuth Verlag, Berlin.
- Dinh, H. T., Küver, J., Mussmann, M., Hassel, A. W., Strathmann, M., Widdel, F. (2004). Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms. *Nature* **427**: 829-832.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 881-890.
- Eisenschmid, K., Stetter, A. (1998). Praxiserfahrungen bei der Lösung von Störstoffproblemen. *Wochenbl. Papierfabr.* **126**: 796-802.
- Faber, W., Vollmuth, S. (2007). Entlastung der Produktions und Wasserkreisläufe. *Produktinformation Sachtleben Chemie GmbH*. Duisburg.
- Fan, M., Brown, R. C., Sung, S. W., Huang, C.-P., Ong, S. K., Leeuwen, J. H. v. (2003). Comparisons of polymeric and conventional coagulants in arsenic(V) removal. *Water Environ. Res.* **75**: 308-313.
- Fernandes, M. (2006). Studies on the processes of bacteria elimination in constructed wetlands. *Prozesswissenschaften*. Technische Universität Berlin, Berlin.
- Flemming, H.-C. (1991a). Biofilms as a particular form of microbial life. In: *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. Flemming, H.-C., Geesey, G. G. (eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, S. 3 - 9.
- Flemming, H.-C. (1991b). Biofilme und Wassertechnologie Teil I: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen. *gwf Wasser Abwasser* **132**: 197-207.
- Flemming, H.-C. (1994). *Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen*. Kommissionsverlag R. Oldenbourg, Stuttgart.-München.
- Flemming, H.-C. (1996). Biofouling and microbially influenced corrosion (MIC) - an economical and technical overview. In: *Microbial deterioration of materials*. Heitz, E., Sand, W., Flemming, H.-C. (eds.). Springer Verlag, Heidelberg, S. 5-14.
- Flemming, H.-C. (2008). Biofilms. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, S. 1-10.
- Flemming, H.-C., Neu, T. R., Wozniak, D. J. (2007). The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells". *J. Bacteriol.* **189**: 7945-7947.
- Gagnona, G. A., Slawson, R. M. (1999). An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water. *J. Microbiol. Meth.* **34**: 203-214.
- Gauthier, F., Archibald, F. (2000). The ecology of "fecal indicator" bacteria commonly found in pulp and paper mill water systems. *Water Res.* **35**: 2207-2218.
- Geistbeck, M. (1999). Der optimale Wasserkreislauf im Spannungsfeld zwischen Produktivität und Kosten. *Wochenbl. Papierfabr.* **4**: 231-236.
- Gerardi, M. H. (2002). *Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process*. John Wiley & Sons, New York.
- Gillis, M., Logan, N. (2005). Order IV. "Chromobacterium". In: *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. (eds.). Springer, New York. **Vol. 2**, S. 824-827.
- Gimbel, R., Graham, N. J. D., Collins, M. R. (2006). *Recent progress in slow sand and alternative biofiltration processes*. IWA Publ., London.
- Glass, C., Silverstein, J. (1998). Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Res.* **32**: 831-839.

- Gosh, M. M., Cox, C. D., Prakash, T. M. (1985). Polyelectrolyte selection for water treatment. *J. Amer. Water Works Assoc.* **77**: 67-73.
- Gregory, J. (1973). Rates of flocculation of latex particles by cationic polymers. *J. Colloid Interface Sci.* **42**: 448-456.
- Gregory, J., Duan, J. (2001). Hydrolyzing metal salts as coagulants. *Pure Appl. Chem.* **73**: 2017-2026.
- Gregory, J., Dupont, V. (2001). Properties of flocs produced by water treatment coagulants. *Water Sci. Technol.* **44**: 231-236.
- Gruber, E. (2006). Grundlagen der qualitativen Analytik; Fällung als Trenn- und Nachweismethode. *Chemische Prüfung von Zellstoff und Papier*. Darmstadt: 11.
- Hagedorn-Olsen, C., Moller, I. H., Tottrup, H., Harremoes, P. (1994). Oxygen reduces denitrification in biofilm reactors. *Water Sci. Technol.* **29**: 83-91.
- Hahn, H. H. (1987). *Wassertechnologie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Haller, K., Lewing, B. D. (1995). Leimung von Papier und Karton mit Bernsteinsäureanhydrid. *PTS-Manuskript*. München.
- Hamilton, W. A. (1985). Sulphate-reducing bacteria and anerobic corrosion. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**: 195-217.
- Hancke, K., Wilhelm, S. (2003). *Wasseraufbereitung Chemie und chemische Verfahrenstechnik*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Healy, L. W., Mer, V. K. L. (1962). The adsorption flocculation reactions of a polymer with an aqueous colloidal dispersion. *J. Phys. Chem.* **66**: 1835.
- Heitz, E., Flemming, H.-C., Sand, W. (1996). *Microbially influenced corrosion of Materials*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Henze, M., Harremoes, P., Jensen, J. L. C., Arvin, E. (2001). *Wastewater Treatment - Biological and Chemical Processes*. Springer Verlag, Berlin.
- Hobbie, J. E., Daley, R. J., Jaspers, S. (1977). Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1225-1228.
- Holleman, A. F., Wiberg, N., Wiberg, E. (1985). *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Imhoff, K., Imhoff, K. R. (1976). *Taschenbuch der Stadtentwässerung*. R. Oldenbourg Verlag, München, Wien.
- Javaherdashti, R. (2008). *Microbiologically Influenced Corrosion*. Springer, London.
- Jetten, M. S., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K. T., Schalk, J., van Dongen, U. G., van de Graaf, A. A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M. C., Kuenen, J. G. (1998). The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 421-437.
- Jiang, J.-Q. (2001). Development of coagulation theory and new coagulants for water treatment: It's past, current and future trend. *Wat. Supply* **1**: 57-64.
- Jung, H., Demel, I., Götz, B. (2006). Wasser- und Abwassersituation in der deutschen Papierindustrie – Ergebnisse der Wasserumfrage 2004. *Wochenbl. Papierfabr.* **9**: 478-481.
- Kahl, T. (1997). Das Positek- Verfahren als Mittel zur Optimierung der Füllstoffretention. *Wochenbl. Papierfabr.* **125**: 8-11.
- Kaltenbach, J. (1960). *Leimungsprobleme nach neueren Erkenntnissen*. Dr. Sändig Verlag KG, Wiesbaden.
- Kasper, D. R. (1971). Theoretican and experimental investigations of the flocculation of charged particles in aqueous solutions by polyeletrolytes of opposite charge. *Thesis*. California Institute of Technology, Pasadena, CA.

- Keeney, D. R., Fillery, I. R., Marx, G. P. (1979). Effect of Temperature on the Gaseous Nitrogen Products of Denitrification in a Silt Loam Soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **43**: 1124-1128.
- Kerschen, E. J., Irani, V. R., Hassett, D. J., Rowe, J. J. (2001). snr-1 gene is required for nitrate reduction in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **183**: 2125-2131.
- Kilb, B., Lange, B., Schaule, G., Flemming, H.-C., Wingender, J. (2003). Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **206**: 563-573.
- Klahre, J., Lustenberger, M., Flemming, H.-C. (1996). Mikrobielle Probleme in der Papierfabrikation. *Das Papier* **50**: 47-53.
- Klahre, J., Lustenberger, M., Wingender, J., Flemming, H.-C. (1997). Mikrobielle Probleme in der Papierfabrikation Teil 2. Nachweis und Analytik. *Das Papier* **5**: 228-238.
- Kleemann, S. (2006). Vortragsreihe des ZELLCHEMING-Fachausschusses Chemische Additive (CHAD): "Chemische Additive - funktionell unentbehrlich und ökologisch nützlich". *Wochenbl. Papierfabr.* **22**: 1297-1299.
- Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiol. Rev.* **46**: 43-70.
- Kohler, A., Kreutzer, K. P., Martin, G. (1999). Polyaluminiumhydroxychlorid (PAC). Eine sinnvolle Ergänzung zu synthetischen kationischen Fixiermitteln. *Wochenbl. Papierfabr.* **17**: 1076-1084.
- Koike, I., Wada, E., Tsuji, T., Hattori, A. (1972). Studies on denitrification in a brackish lake. *Arch. Hydrobiol.* **69**: 508-520.
- Koppe, P. (1979). Die Bestimmung der abfiltrierbaren und absetzbaren Stoffe in Wässern. *Vom Wasser* **52**: 49-59.
- Körner, H., Zumft, W. G. (1989). Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1670-1676.
- Künzel, U., Le, P. C. (2003). Aluminiumverbindungen am Beispiel holzhaltiger Druckpapiere. *Das Papier* **9**: 37-41.
- Künzel, U., Prinz, M. (2006). Fixiermittel zur Störstoffbekämpfung am Beispiel holzhaltiger Druckpapiere. *Wochenbl. Papierfabr.* **22**: 1324-1328.
- Le, P.-C., Grenz, R., Völkel, H.-G. (2002). Verbesserung der Runnability und der Qualität von Papier und Karton durch die Verminderung von Wechselwirkungen zwischen Additiven und Störstoffen. *Das Papier* **2**: 29-33.
- Lemmer, H., Roth, D., Schade, M. (1993). Population density and enzyme activities of heterotrophic bacteria in sewer biofilms and activated sludge. *Water Res.* **28**: 1341-1346.
- Letterman, R. D., Pero, R. W. (1988). Polyelectrolyte coagulants in water treatment - An assessment of research needs. *AWWA Research Foundation*. Denver, Colorado.
- Linhart, F. (1989). Eine dimensionsanalytische Betrachtung über die Wirkungsweise von Retentionsmitteln. *Wochenbl. Papierfabr.* **10**: 405-412.
- Little, B., Wagner, P., Mansfeld, F. (1992). An overview of microbiologically influenced corrosion. *Electrochim. Acta* **37**: 2185-2194.
- Lohaus, L., Petersen, L. (2006). Dauerhaftigkeit von abgedeckten Stahlbetonbehältern im Kläranlagenbau. *KA Abwasser Abfall* **53**.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. (2006). *Brock Mikrobiologie*. Pearson Education Deutschland GmbH, München.
- Magalhaes, C. M., Joye, S. B., Moreira, R. M., Wiebe, W. J., Bordalo, A. A. (2005). Effect of salinity and inorganic nitrogen concentrations on nitrification and

- denitrification rates in intertidal sediments and rocky biofilms of the Douro river estuary, Portugal. *Water Res.* **39**: 1783-1794.
- Mania, M., Jekel, M. (2006). Exportorientierte Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet der Wasserver- und -entsorgung Teil I: Trinkwasser. Band 2: Leitfaden. Berlin, Technische Universität Berlin: 33.
- Marty, N., Dournes, J. L., Chabanon, G., Montrozier, H. (1992). Influence of nutrient media on the chemical composition of the exopolysaccharide from mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **98**: 35-44.
- Mateju, V., Cizinska, S., Krejci, J., Janoch, T. (1992). Biological water denitrification: A review. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 170-183.
- McCarthy, P. L., Beck, L., Amant, S. P. (1969). Biological denitrification of wastewaters by additions of organic materials. 24th Annual Purdue Industrial Waste Conference, Purdue University, Lafayette, Ind.
- McCrary, M. H. (1915). The numerical interpretation of fermentation-tube results. *J. Infect. Dis.* **17**: 183-212.
- Michaels, A. S. (1954). Aggregation of suspensions by polyelectrolytes. *Ind. Eng. Chem.* **46**: 1485.
- Mudrack, K., Kunst, S. (2003). *Biologie der Abwassereinigung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Op den Camp, H., Kartal, B., Guven, D., van Niftrik, L., Haaijer, S., van der Star, W., van de Pas-Schoonen, K., Cabezas, A., Ying, Z., Schmid, M., Kuypers, M., van de Vossenberg, J., Harhangi, H., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M., Kuenen, J., Strous, M., Jetten, M. (2006). Global impact and application of the anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **34**: 174-178.
- Packham, R. F. (1967). Polyelectrolytes in water clarification. *Proc. Soc. Water Treat. Exam.* **16**: 88-111.
- Parthasarathy, N., Buffle, J. (1985). Study of polymeric aluminium(III) hydroxide solution for application in waste water treatment. Properties of the polymer and optimal conditions of preparations. *Water Res.* **19**: 25-36.
- Pauly, D., Dietz, W. (2006). Vermeidung von Biofilmbildung in Stoff- und Wassersystemen durch optimierte Prozessführung in Altpapier verarbeitenden Produktionsanlagen. München, PTS.
- Pekdemir, T., Kacmazoglu, E. K., Keskinler, B., Algur, Ö. F. (1998). Drinking water denitrification in a fixed bed packed biofilm reactor. *Tr. J. of Eng. Environ. Sci.* **22**: 39-45.
- Pelzer, R., Künzel, U. (2006). Polyacrylamide (PAM) zur Prozesswasserbehandlung am Beispiel holzhaltiger Druckpapiere. *Wochenbl. Papierfabr.* **22**: 1320-1323.
- Pernitsky, D. J. (2003). Coagulation. *TechTrans*. Calgary, Alberta.
- Philippot, L. (2005). Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 200-2004.
- Pinakoulaki, E., Soulimanes, T., Varotsis, C. (2002). Fourier transform infrared (FTIR) and step-scan time-resolved FTIR spectroscopies reveal a unique active site in cytochrome caa3 Oxidase from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **277**: 32867-32874.
- Prechtel, S., Faulstich, M. (2006). *Ursachen und Mechanismen der Korrosion in biologischen Anlagen*. Verlag Förster Druck und Service, Sulzbach-Rosenberg.
- Prinz, M., Schultz, W.-S. (2006). Leimungsmittel für Masse- und Oberflächenapplikation. *Wochenbl. Papierfabr.* **22**: 1329-1335.

- Purtschert, I., Siegrist, H., Gujer, W. (1996). Denitrifikation mit Methanol in Belebungsanlagen. *GWA* **11**: 847-853.
- Rauch, P. (1984). Korrosion von Beton und Stahlbeton durch chemische Verbindungen und Mikroorganismen. *Institut für technische Mikrobiologie*, Hamburg.
- Reasoner, D. J., Geldreich, E. E. (1984). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1-7.
- Riedel, E. (1989). *Anorganische Chemie*. de Gruyter Verlag, Berlin; New York.
- Rode, A. (2004). Isolierung und Charakterisierung von bakteriellen extrazellulären polymeren Substanzen aus Biofilmen. *Dissertation, Fakultät für Naturwissenschaften*. Universität Duisburg-Essen, Duisburg.
- Ryzhova, I. M. (1979). Effect of nitrate concentration on the rate of soil denitrification. *Pochvovedeniye* **3**: 54-58.
- Saby, S., Sibille, I., Mathieu, L., Paquin, J. L., Block, J. C. (1997). Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1564-1569.
- Salem, Z., Lebig, H., Cherafa, W. K., Allia, K. (2007). Valorisation of olive pits using biological denitrification. *Desalination* **204**: 72-78.
- Santegoeds, C. M., Schramm, A., de Beer, D. (1998). Microsensors as a tool to determine chemical microgradients and bacterial activity in wastewater biofilms and flocs. *Biodegradation* **9**: 159-167.
- Saraste, M., Castresana, J. (1994). Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes. *FEBS Lett.* **341**: 1-4.
- Scheen, J. (2003). Einfluss des C:N:P-Verhältnisses auf die Bildung von Biofilmen. *Dissertation, Fachbereich Chemie*. Universität Dortmund, Dortmund.
- Schmidt, T. (1999). Kreislaufschließung - Maßnahmen und Folgen. *Wochenbl. Papierfabr.* **4**: 227-230.
- Schneider, T. (2003). Prozesschemikalien. *Wochenbl. Papierfabr.* **3**: 81-87.
- Schrijver, J., Wirth, B. (2006). Biozide zur Vermeidung von Ablagerungen am Beispiel von Wellpappenrohlpapier. *Wochenbl. Papierfabr.* **22**: 1336-1342.
- Schulte, S. (2003). Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid gegenüber Bakterien. *Dissertation, Fakultät für Naturwissenschaften*. Universität Duisburg-Essen, Duisburg.
- Sharpe, A. N., Kilsby, D. C. (1970). Ultrasound and vortex stirring as bacteriological sampling methods for foods. *J. Appl. Bacteriol.* **33**: 351-357.
- Sharpe, A. N., Jackson, A. K. (1972). Stomaching: a new concept in bacteriological sample preparation. *Appl. Microbiol.* **24**: 175-178.
- Siebel, E., Wang, Y., Egli, T., Hammes, F. (2008). Correlations between total cell concentration, total adenosine tri-phosphate concentration and heterotrophic plate counts during microbial monitoring of drinking water. *Drink. Water Eng. Sci. Discuss.* **1**: 71-86.
- Stal, L. J., al., e. (1989). Group report: Cellular physiology and interactions of biofilm organisms. In: *Structure and function of biofilms*. Characklis, W. G., Wilderer, P. A. (eds.). John Wiley, New York, S. 269-286.
- Stier, E., Baumgart, H.-C., Fischer, M. (2003). *Handbuch für Umwelttechnische Berufe [Ver- und Entsorger] Band 3 Abwassertechnik*. F. Hirthammer Verlag, München.
- Stumm, W., Morgan, J. J. (1962). Chemical aspects of coagulation. *J. Amer. Water Work. Assoc.* **54**: 971-994.



- Suihko, M.-L., Sinkko, H., Partanen, L., Mattila-Sandholm, T., Salkinoja-Salonen, M., Rassa, L. (2004). Description of heterotrophic bacteria occurring in paper mills and paper products. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 1228-1235.
- Tavares, P., Pereira, A. S., Moura, J. J. G., Moura, I. (2006). Metalloenzymes of the denitrification pathway. *J. Inorg. Biochem.* **100**: 2087-2100.
- Thomsen, J. K., Geest, T., Cox, R. P. (1994). Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 536-541.
- Thurmann, E. M. (1985). *Organic Geochemistry of Natural Waters*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Ucisik, A. S., Henze, M. (2004). Biological denitrification of fertiliser wastewater at high chloride concentration. *Water SA* **30**: 191-195.
- van der Kooij, D. (2003). Managing regrowth in drinking-water distribution systems. In: *Heterotrophic plate counts and drinking-water safety*. Bartram, J., Cotruvo, J., Exner, M., Fricker, C., Glasmacher, M. (eds.). IWA Publishing, London, S. 199–232.
- van Ommen Kloeke, F., Geesey, G. G. (1999). Localization and identification of populations of phosphate-active bacterial cells associated with activated sludge flocs. *Microb. Ecol.* **38**: 201 - 214.
- van Rijn, J., Tal, Y., Barak, Y. (1996). Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2615-2620.
- vdp-online (2007). Papier machen. *Informationen zu Rohstoffen und Papierherstellung*, Verband Deutscher Papierfabriken (VDP). Bonn.
- Weigl, J. (1979). Füllstoffretention. *Das Papier* **33**: 105-108.
- Wiesner, M. R., Klute, R. (1997). *Properties and Measurements of particulate contaminants in water*. AWWARF, Denver.
- Wilderer, P. A., Jones, W. L., Dau, U. (1987). Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite. *Water Res.* **21**: 239-245.
- Wimpenny, J. (2000). *An overview of biofilms as functional communities*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wingender, J., Flemming, H.-C. (2004). Contamination potential of drinking water distribution network biofilms. *Water Sci. Technol.* **49**: 277-286.
- Wingender, J., Neu, T. R., Flemming, H.-C. (1999). *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Wuertz, S., Bishop, P., Wilderer, P. (2003). *Biofilms in wastewater treatment. An interdisciplinary approach*. IWA Publications, London.
- Yatong, X. (1995). Influence of pH and temperature on denitrification. *Water Treat.* **10**: 81-88.
- Ye, R. W., Averill, B. A., Tiedje, J. M. (1994). Denitrification: production and consumption of nitric oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1053-1058.
- Zippel, F. (1999). Wasserkreislauf-Technologien - historische Entwicklung. *Wochenbl. Papierfabr.* **3**: 137-140.

## 7 Anhang

### 7.6 Lebenslauf

Arne Hörsken

Beim Knevelshof 41, 47249 Duisburg

#### PERSÖNLICHE DATEN

---

Geburtsdatum: 26. Februar 1972 in Duisburg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

#### SCHULBILDUNG

---

1978 – 1982 Gemeinschaftsgrundschule Gartenstrasse, Duisburg  
1982 – 1991 Elly-Heuss-Knapp-Gymnasium, Duisburg

#### WEHRDIENST

---

1991 – 1992 Sanitäts- und Stabsdienst in der Schillkaserne in Wesel

#### HOCHSCHULBILDUNG

---

1992 – 1998 Chemie-Studium an der Gerhard-Mercator-Universität-GH-Duisburg, heute Universität Duisburg-Essen. Abschluss als Diplom-Chemiker  
1995 – 1996 Stipendium des DAAD: Chemiestudium an der McMaster University in Hamilton, Ontario, Kanada. Dort Erstellung einer Bachelor Thesis und Tutor für Erstsemesterstudenten  
seit 08/2004 Promovent im Fachgebiet Aquatische Mikrobiologie (Prof. Dr. Flemming) an der Universität Duisburg-Essen

#### BERUFLICHER WERDEGANG

---

07/1993 – 09/1998 während der Semesterferien als Schwimmmeister für die Stadt Duisburg tätig  
01/1996 – 02/1998 Studentischer Mitarbeiter am Institut für Wasserchemie und Wassertechnologie (IWW) in Mülheim an der Ruhr  
03/1998 – 11/1998 Wissenschaftliche Hilfskraft im Fachgebiet Aquatische Mikrobiologie an der Gerhard-Mercator-Universität Duisburg  
11/1998 – 12/2006 Sales Manager bei der Sachtleben Chemie GmbH in Duisburg, Abteilung Wasserchemie  
01/2007 – 03/2008 Produkt Manager bei der Sachtleben Chemie GmbH in Duisburg, Abteilung Wasserchemie  
04/2008 – 11/2008 Chemisch-Technischer Koordinator bei der Sachtleben Wasserchemie GmbH in Duisburg/Ibbenbüren

## WEITERBILDUNGEN

---

10/1997	DECHEMA-Fortbildungskurs "Korrosion und Korrosionsschutz"
1997 – 1998	Spanisch-Kurse an der Gerhard-Mercator-Universität Duisburg
03/2001	Seminar „Konflikttraining“
10/2001	Seminar VA-Akademie „Verkaufstraining Stufe 1“
07/2003	Dynamit Nobel Firmenseminar „Grundlagen der Betriebswirtschaft“
02/2004	Seminar PTS „Qualitätskontrolle und -sicherung durch mikroskopische Prüfung von Fasern, Füllstoffen und Papier“
09/2004	Seminar „Management of Change“ mit Jens Corssen
05/2005	Seminar Unilog Integrata „Vortrags- und Redetechnik/Rhetorik“
10/2005	Seminar Unilog Integrata „Schlagfertig und gelassen“
1996 – 2008	Microsoft Office: Word, Excel, PowerPoint, Access, Project
1996 – 2008	Software-Kurse: SAP, Lotus-Notes, Windream, HTML

## 7.7 Publikationsliste

Hörsken, A., Zheng, G., Stradiotto, M., McCrory, C.T.C. and Li, L. (1998). Iron Dinitrosyl Complexes Containing TCNE: A Synthetic, X-ray Crystallographic, High Field NMR, and Electrochemical Study. J. Organomet. Chem. **558**: 1-9.